



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TESE

**QUALIDADE, POTENCIAL FUNCIONAL E PERFIL BIOQUÍMICO DE
PORÇÕES DE INFRUTESCÊNCIAS DO ABACAXIZEIRO ‘PÉROLA’,
‘VITÓRIA’ E ‘IMPERIAL’**

TALITA DE FARIAS SOUSA BARROS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CAMPUS II – AREIA – PB**

**QUALIDADE, POTENCIAL FUNCIONAL E PERFIL BIOQUÍMICO DE
PORÇÕES DE INFRUTESCÊNCIAS DO ABACAXIZEIRO ‘PÉROLA’,
‘VITÓRIA’ E ‘IMPERIAL’**

TALITA DE FARIAS SOUSA BARROS

Sob a orientação da professora

SILVANDA DE MELO SILVA, PhD

Tese submetida como requisito
para obtenção do grau de **Doutor
em Agronomia**, no Programa de
Pós Graduação em Agronomia.

Areia, PB

Abril de 2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Qualidade, potencial funcional e perfil bioquímico de porções de infrutescências do abacaxizeiro ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’

AUTOR: TALITA DE FARIAS SOUSA BARROS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em
AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela comissão Examinadora:

Prof^ª. Silvanda de Melo Silva, PhD
Orientadora
PPGA/CCA/UFPB

Prof. DSc. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses
Examinador
UEPB

Pesq. DSc. Renato Lima Dantas
Examinador
PDJ/CNPq/PPGA

Prof^ª. DSc. Rejane Maria Nunes Mendonça
Examinadora
PPGA/CCA/UFPB

Data da realização: 26 de Abril de 2017.

Presidente da Comissão Examinadora
Prof^ª. Silvanda de Melo Silva, PhD
Orientadora

DEDICO

A guerreira Jeanne Valéria de Farias Sousa Albuquerque, a famosa Ianne, minha mãezinha linda, um exemplo sem igual de dedicação, amor, força, mulher, mãe, amiga, a ela dedico todo o empenho da minha vida.

OFEREÇO

Ao corpo docente do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, e aos alunos deste campus, que este trabalho possa lhes ser útil, como base para futuros trabalhos desenvolvidos em Bioquímica na grande área Ciências Agrárias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso Pai celestial, fonte de vida, sabedoria e felicidade.

A minha família, especialmente a Ianne, minha mãezinha querida, mulher batalhadora que me ensinou os caminhos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano.

Ao meu marido, Breno Vasconcelos Tomé, meu companheiro e amigo que elegi pra viver, amar e ser a base sólida da vida que escolhemos construir juntos.

A Universidade Federal da Paraíba, por ter proporcionado momentos significativos para o meu desenvolvimento profissional e humano.

A todos os queridos professores, deles levarei grandes exemplos de profissionais e de amizade.

Aos amigos que me incentivaram nessa jornada, Darlene Maria, Élica Rios, Leandro Firmino, Nemora Cavalcante, Nicholas Lucena e Samara Silva.

Ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita da Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de aprendizado concedida.

A minha orientadora, Professora Silvanda de Melo Silva, PhD, pela sua orientação, dedicação, boa vontade, confiança, humildade no repasse dos conhecimentos, pelas nossas conversas sérias e descontraídas e também pela sua sincera amizade e excelente exemplo de pessoa e professora.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita, especialmente a Alex Sandro, Ana, Augusto, Dona Rosa, Fernando, Leonardo e Renato, pelos momentos de descontração e de conhecimentos compartilhados.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, sob a Coordenação do Professor Carlos Alberto de Almeida Gadelha, pela permissão da realização das análises de eletroforese, com a colaboração de Edilza Silva do Nascimento e Alesson Santos.

Aos professores: Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, Rejane Maria Nunes Mendonça, Renato Lima Dantas, Silvanda de Melo Silva, pela participação na banca examinadora, contribuindo com valiosas sugestões.

Enfim, a todos que fizeram parte da minha vida durante esses quatro anos, meu muito: Obrigada!!!

EPÍGRAFE

“Deus é amor; está escrito em cada botão de flor que se abre e em cada folha que cresce no campo. Os belos pássaros, que alegram o ar com seus cantos, as flores, perfeitas e delicadamente coloridas, que perfumam o ar, as árvores frondosas da floresta, com sua exuberante e viçosa folhagem – tudo dá testemunho do cuidado paternal do nosso Deus e do desejo que Ele tem de tornar os Seus filhos felizes.”

Ellen G. White.

BARROS, T. F. S. **Qualidade, potencial funcional e perfil bioquímico de porções de infrutescências do abacaxizeiro ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’**. Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Trabalho de Tese em Agronomia. Orientadora: Profª. Silvanda de Melo Silva, PhD.

RESUMO GERAL

O Brasil é o terceiro produtor mundial de frutas, gerando um incremento na produção de resíduos agroindustriais. Diante disto, o objetivo desse trabalho foi realizar uma caracterização bioquímica de porções de polpa, talo, casca e coroa de três variedades de infrutescências de abacaxizeiro. Os abacaxis foram adquiridos na maturidade comercial, caracterizada pelas malhas da base levemente alaranjadas na base da fruta, em quatro repetições de 20 frutos/variedade (Pérola, Vitória e Imperial). Os frutos foram provenientes de diferentes municípios produtores de abacaxi localizados Mata Paraibana e transportados ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Foram realizadas avaliações físicas e físico-químicas, quantificação dos compostos fenólicos, do teor de proteínas solúveis, avaliação da atividade antioxidante, atividades enzimáticas (SOD, CAT, POD e APX), atividade proteolítica e específica da bromelina e eletroforese SDS-PAGE. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Realizou-se também uma análise de componentes principais (PCA). Para as características físicas, os atributos de massa fresca, comprimento e firmeza diferiram entre as variedades, e os relacionados ao diâmetro e rendimento não diferiram da ‘Vitória’ e da ‘Imperial’, estas também se destacaram em relação à ‘Pérola’ quanto ao maior teor de sólidos solúveis. Os maiores valores de acidez titulável (AT) tanto para polpa quanto para o talo foram encontrados no ‘Vitória’. O pH diferiu entre as variedades, sendo que a ‘Imperial’ apresentou pH superior. Os maiores teores de ácido ascórbico foram registrados no ‘Pérola’. Para os conteúdos de polifenóis extraíveis totais (PET), a porção coroa sobressaiu-se em relação às demais porções, independentemente das variedades avaliadas, seguida da casca, polpa e talo. O ‘Vitória’ apresentou mais baixa capacidade antioxidante pelo método de DPPH’. Por outro lado, para a atividade enzimática, tanto para SOD, CAT, POD e APX, esta variedade se destacou pelas maiores atividades enzimáticas independentemente da porção avaliada. Em relação à atividade proteolítica, nas porções polpa e talo, o abacaxi ‘Pérola’ apresentou maior média, enquanto que nas porções casca e coroa, o ‘Imperial’

se destacou em relação às cultivares ‘Pérola’ e ‘Vitória’, respectivamente. A atividade específica variou de 53 U.mg⁻¹ para a porção talo no abacaxi ‘Vitória’ a 453 U.mg⁻¹ para a porção polpa do ‘Pérola’. A variabilidade da atividade bromelina existente nas diferentes porções estudadas foi explicada, em 99%, por dois componentes principais, a CP-1 = 74% e a CP-2 = 25%. Em análise de gel eletroforese, os principais componentes de proteínas expressos nos extratos das porções polpa, talo, casca e coroa das três variedades de abacaxi estudadas apresentaram peso molecular de aproximadamente 24 kDa para o ‘Pérola’ e ‘Vitória’ e 26 kDa para ‘Imperial’. As porções coroas e cascas se configuram como melhor fonte de bromelina que as porções polpa e talo para as variedades ‘Vitória’ e ‘Imperial’. Neste contexto, ressalta-se a importância da utilização dos resíduos industriais do processamento do abacaxi para a obtenção de bromelina e compostos benéficos a saúde humana.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, enzimas antioxidantes, resíduos agroindustriais, ROS bromelina.

BARROS, T. F. S. **Quality, functional potential, and biochemical profile of portions of infructescences of Pérola, Vitória and Imperial pineapple.** Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Thesis in Agronomia. Supervisor: Prof^ª. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

OVERVIEW

Brazil is the third largest producer of fruit, generating an increase in the production of agroindustrial waste. In view of this, the objective of this work was to perform a biochemical characterization of pulp, stem, shell, and crown portions of three varieties of pineapple infructescences. Pineapples were purchased at the commercial maturity, characterized by slightly orange meshes at the base of the fruit, in four replicates of 20 fruits / variety (Pérola, Vitória and Imperial). The fruits came from different pineapple producing municipalities located in Mata Paraibana, Paraíba State, Brazil, and transported to the Laboratorio de Biologia e Tecnologia Pos-Colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Physical and physicochemical evaluations, quantification of phenolic compounds, soluble protein content, antioxidant activity evaluation, enzymatic activities (SOD, CAT, POD, and APX), proteolytic and specific activity of bromelain and SDS-PAGE electrophoresis were performed. The data were submitted to ANOVA and the means were compared by the Tukey test at 5% probability. A principal component analysis (PCA) was also performed. For the physical characteristics, the attributes of fresh mass, length and firmness differed among the varieties, and those related to the diameter and yield did not differ from 'Vitória' and 'Imperial', these also stood out in relation to 'Pérola' the higher soluble solids content. The highest titratable acidity (AT) contents for both pulp and stalk were found in 'Vitória'. The pH differed among the varieties, and the 'Imperial' had higher pH. The highest levels of ascorbic acid were registered in the 'Pérola'. For the contents of total extractable polyphenols (PET), the crown portion stood out in relation to the other portions, independently of the evaluated varieties, followed by the shell, pulp, and stalk. The 'Vitória' presented lower antioxidant capacity by the DPPH[•] method. On the other hand, for the enzymatic activity, for SOD, CAT, POD, and APX, this variety was distinguished by the greater enzymatic activities independently of the portion evaluated. Regarding the proteolytic activity, in the pulp and stalk portions, 'Pérola' pineapple presented a higher average, while in the shell and crown portions, 'Imperial' stood out in relation to 'Pérola' and 'Vitória' cultivars, respectively. The specific activity ranged from

53 U.mg⁻¹, for the stem portion in 'Vitória' pineapple, to 453 U.mg⁻¹ for the 'Pérola' pulp portion. The variability of bromelain activity in the different portions studied was explained in 99% by two principal components: CP-1 = 74% and CP-2 = 25%. In the analysis of gel electrophoresis, the main components of proteins expressed in extracts of the pulp, stem, shell, and crown portions of the three pineapple varieties studied presented molecular weight of approximately 24 kDa for 'Pérola' and 'Vitória' and 26 kDa for 'Imperial'. The crown and shell portions are configured as the best source of bromelain as the pulp and stem portions for the 'Vitória' and 'Imperial' varieties. In this context, the importance of the use of the industrial residues of the pineapple processing to obtain bromelina and other compounds beneficial to human health is emphasized.

Keywords: Ananas comosus, antioxidant enzymes, organic residues, ROS bromelain.

LISTA DE SIGLAS

AAT	Atividade Antioxidante Total
APX	Ácido Ascórbico Peroxidase
AsA	Ácido ascorbato
AT	Acidez Titulável
CAT	Catalase
CP	Componentes Principais
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
Grx	Glutaredoxina
GSH	Glutathione
KDa	Kilodalton
N	Firmeza
O ₂	Oxigênio molecular
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PCA	Análise de Componentes Principais
PET	Polifenóis Extraíveis Totais
pH	Potencial Hidrogeniônico
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
-SH	Grupos sulfidila
SOD	Superóxido dismutase
SS	Sólidos Solúveis
-SS	Pontes dissulfeto
SS/AT	Relação Sólidos Solúveis por Acidez Titulável
Trx	Tioredoxina

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico	39
Tabela 2. Composição de aminoácidos da bromelina do caule.....	45
Tabela 3. Massa molecular, pH ótimo e temperatura ótima de bromelina	47

CAPÍTULO II

Tabela 1. Características físicas de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’	48
Tabela 2. Características físico-químicas das porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	48
Tabela 3. Compostos fenólicos das porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	49
Tabela 4. Atividade antioxidante das porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	50
Tabela 5. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	84
Tabela 6. Atividade enzimática da catalase (CAT) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	85
Tabela 7. Atividade enzimática da ácido ascorbato peroxidase (APX) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	86
Tabela 8. Atividade enzimática da peroxidase (POD) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial	87

CAPÍTULO III

Tabela 1. Teor de proteínas, atividade proteolítica e específica de bromelina em extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi Pérola, Vitória e Imperial	114
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Formação do $O_2\cdot$ em cadeias de transporte de elétrons (a) na fotossíntese ocorre no PS-I; (b) na respiração nos complexos I e III	32
Figura 2. Distribuição da demanda de enzimas em diferentes áreas	38
Figura 3. Representação esquemática de vários passos e supostos intermediários e estados de transições, no caminho da reação para hidrólise de um substrato amida por uma cisteína-peptidase	40
Figura 4. Estrutura terciária da bromelina do talo, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos em destaque são referentes à tríade catalítica, estes resíduos são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho) e Lys-174 (azul). (A – Frente; B – Lado 1; C – Lado 2; D – Fundo)	44

CAPÍTULO II

Figura 1. Curva padrão de ácido gálico, utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico para a determinação de polifenóis extraíveis totais da polpa, talo, casca e coroa de diferentes cultivares de abacaxi	70
Figura 2. Curva padrão de DPPH \cdot utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico de três diluições de extrato de polpa, talo, casca e coroa de diferentes cultivares de abacaxi.....	71

CAPÍTULO III

Figura 1. Curva padrão de Tirosina utilizada como base para a definição das alíquotas dos extratos de bromelina em polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’	110
Figura 2. Curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) e absorbância a 595 nm da solução de determinação de proteína total, utilizando extratos proteicos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’	111
Figura 3. Representação dos escores com 100% de variância explicada para PC-1 (74%) vs PC-2 (25%) em extratos proteicos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’(azul)‘Vitória’ (vermelho) e ‘Imperial’ (verde)	115
Figura 4. Representação dos loadings em relação à proporção da atividade proteolítica e específica da bromelina determinada nas porções polpa, talo, casca e coroa dos abacaxis ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’	115
Figura 5. Eletroforese em gel de policrilamida em SDS das porções polpa, talo, casca e coroa dos abacaxis ‘Pérola’ (Figura A), ‘Vitória’ (Figura B) e ‘Imperial’ (Figura C). M – Marcadores moleculares (Miosina, 200 kDa; -galactosidase, 120 kDa; Soro Bovino, 91 kDa; Glutamina, 62 kDa; Ovoalbumina, 46 kDa; Anidrase Carbônica, 38 kDa; Mioglobina, 26 kDa; Lisozima, 19 kDa; Aprotinina, 9 kDa); 1 – Porção polpa; 2 – Porção talo; 3 – Porção casca; 4 – Porção coroa ..	117

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
OVERVIEW	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
.....	
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO I	
RESUMO	23
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	25
1. Abacaxicultura	25
2. Geração e Desintoxicação Enzimática de Espécies Reativas de Oxigênio em Plantas	26
2.1 Formação de ROS a partir do oxigênio molecular	27
2.2 Geração de ROS em processos metabólicos	29
2.3 Mecanismo de defesa por antioxidantes enzimáticos	32
3. Biotecnologia enzimática e Mercado	36
3.1 Enzimas Proteolíticas	38
3.2 Enzimas Proteolíticas de Interesse para Biotecnologia	41
.....	
3.3 Bromelina: Propriedades Químicas e Bioquímicas	42
3.3.1 Massa molecular, pH e Temperatura ótima para Bromelina	46
2. CONCLUSÃO	48
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO II	
RESUMO	59
ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO	63
2. OBJETIVO GERAL	66
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
.....	
3. MATERIAL E MÉTODOS	67
.....	
3.1 Procedência dos Frutos	67
3.2 Características Avaliadas	67
3.2.1 Comprimento e Diâmetro dos Frutos (mm)	67
3.2.2 Massa Fresca dos Frutos (g)	68
.....	
3.2.3 Firmeza dos Frutos Íntegros (N)	68
3.2.4 Potencial Hidrogeniônico – Ph	68
3.2.5 Sólidos Solúveis (SS%)	68

3.2.6 Acidez Titulável (AT – g.ácido cítrico.100 g ⁻¹ de polpa)	68
3.2.7 Relação SS/AT	69
3.2.8 Ácido ascórbico (mg.100 ⁻¹)	69
.....	
3.3 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante	69
.....	
3.3.1 Extrato Fenólico	69
3.3.2 Determinação dos Compostos Fenólicos (mg. 100 g ⁻¹)	70
3.3.3 Atividade antioxidante total (AAT) através da captura do radical livre DPPH [•] (g de polpa.gDPPH ⁻¹)	71
3.4 Atividade Enzimática e Conteúdo de Proteína Solúvel	72
.....	
3.4.1 Extração das enzimas SOD, CAT, APX, POD	72
3.4.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	72
3.4.3 Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	72
3.4.4 Atividade da Ácido Ascórbico Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)	73
.....	
3.4.5 Atividade da Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)	73
3.4.6 Conteúdo de Proteína Solúvel	73
3.5 Análise Estatística	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 Características físicas e físico-químicas	75
4.2 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante	81
.....	
4.3 Atividade Enzimática	83
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CAPÍTULO III	
RESUMO	98
ABSTRACT	100
1. INTRODUÇÃO	101
2. OBJETIVOS	78
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	78
3. MATERIAL E MÉTODOS	79
3.1 Obtenção e Procedência dos Frutos	79
3.2 Características Avaliadas	79
3.2.1 Atividade Proteolítica da Bromelina (U.min ⁻¹ .mL ⁻¹)	79
3.2.2 Obtenção do Extrato Bruto	79
3.2.3 Caracterização da Bromelina (U.min ⁻¹ .mL ⁻¹)	79
3.2.4 Teor de Proteína Total (mg.g ⁻¹)	80
3.2.5 Atividade Específica das Enzimas Proteolíticas (U.mg ⁻¹)	81
3.2.6 Eletroforese	81
3.3 Análise Estatística	81

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1 Determinações da Atividade Proteolítica e Específica da Bromelina	83
4.2 Eletroforese	87
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

O abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma das frutas tropicais mais apreciadas no mundo. Sua ampla aceitação pode ser atribuída às excelentes características sensoriais, principalmente o sabor ácido-adocicado, fonte de fibras e vitamina C (LIMA et al., 2016). O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de infrutescências de abacaxizeiro (FAOSTAT, 2016), sendo esta produção destinada predominantemente ao mercado interno e em menor extensão à exportação, concentrando-se, como principais importadores Itália, Alemanha e Países Baixos (AGRIANUAL, 2014).

O Brasil tem uma posição mundial de destaque na produção de frutas, que podem ser comercializados frescos ou na forma de produtos processados. O processamento tem várias vantagens, como o aproveitamento de frutas fora dos padrões para comercialização na forma fresca, aumento da vida útil do produto, facilidade no transporte, obtenção de novos produtos, assim como a exploração de novos mercados (MATOS, 2013).

No ano de 2015, o Brasil produziu aproximadamente 2,0 milhões de toneladas de abacaxi (FAOSTAT, 2016). O Nordeste devido às condições climáticas favoráveis é a maior região produtora no país respondendo por 40% na produção total. Neste cenário, o estado da Paraíba, principal produtor da região Nordeste contribui com 18,54% da produção nacional (IBGE, 2016), gerando renda e elevando a qualidade de vida das famílias de agricultores. Entretanto, do abacaxizeiro apenas o fruto é consumido, sendo as cascas, talos, coroa e folhas considerados resíduos no preparo para consumo fresco, bem como para a indústrias de sucos e conservas. Em alguns frutos, estas porções têm despontado como uma promissora fonte de nutrientes, compostos fenólicos e antioxidantes, superior inclusive ao conteúdo observado na polpa (ABBASI et al., 2015), o que vem despertando expressivo interesse científico e comercial.

Os compostos fenólicos incluem inúmeros compostos com diferentes estruturas químicas e encontram-se distribuídos entre as distintas partes das plantas. Além de suas funções anti-inflamatórias, antibacterianas, e antivirais, muitos fenólicos são antioxidantes mais potentes que antioxidantes vitamínicos (ORREGO, 2015). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos devem-se ao seu potencial de oxirredução, atuando como agentes redutores em que doam átomos de hidrogênio e neutralizam radicais livres (ALMEIDA, 2009, IGNAT et al., 2011). Segundo

Helena et al., (2015) e Bi et al. (2014), os compostos fenólicos presentes nos vegetais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante. A proteção atribuída aos antioxidantes é decorrente da sua ação redutora frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SILVA et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são comumente formadas sob condições de estresse biótico e abiótico (TANG et al., 2016). Os ROSs causam danos em lipídios de membrana (afetando sua permeabilidade), proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos (RAJENDRAN, et al., 2014). Nas plantas, existe um complexo sistema de defesa antioxidativo enzimático, o qual inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX). Existem também outros antioxidantes que ocorrem naturalmente nas plantas, tais como isoflavina, fenóis, poliaminas e aminoácidos específicos, como cisteína e metionina (QUÍÑONES et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2014; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, et al., 2015; TANG et al., 2016), que protege os tecidos dos altos níveis das ROS.

A bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas principalmente nas plantas da família da Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido (NADIZARAH et al., 2014). A bromelina tem tido ampla aplicação na indústria de alimentos, podendo ser utilizada também em indicações clínicas, tais como: agentes antitumorais, modulação imune, limpeza de feridas, aumento do efeito de antibióticos, ação anti-inflamatória, ação mucolítica, auxílio na digestão, aplicações em doenças cardiovasculares e circulatórias, em procedimentos cirúrgicos e ferimentos da musculatura esquelética (AICHELE et al., 2013).

Na indústria de alimentos, a bromelina pode ser utilizada no amaciamento de carnes vermelhas, na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor de proteínas, na produção de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e isolados proteicos, na cervejaria para hidrolisar certos complexos proteína-tanino, formados durante a fermentação, que se presente na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando gelada (SABAA, 1999). Dentre as inúmeras vantagens de sua utilização, merece destaque o fato delas serem ecologicamente mais viáveis, pois pode ser obtida, por exemplo, a partir de resíduos agrícolas e agroindustriais do abacaxizeiro (NADIZARAH et al., 2013). Portanto, devido suas amplas aplicações sua atividade deve ser avaliada em diferentes porções dos frutos.

O Brasil diferencia-se completamente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda sua produção é consumida na forma fresca, sendo

a quantidade industrializada bem inferior (BERTEVELLO, 2011). Uma das principais fontes de matérias prima para a extração de enzimas proteolíticas no Brasil, não seriam os subprodutos do processamento da fruta e sim os resíduos agrícolas, especialmente o caule que tem demonstrado teores expressivos nos mais recentes estudos de extração de enzimas e nas aplicações terapêuticas da bromelina (HEBBAR et al., 2012).

Considerando-se as elevadas taxas de produção de resíduos agroindustriais geradas a partir das frutas e a importância dos antioxidantes para saúde da população, associado ao surgimento de novas variedades de abacaxizeiro, a exemplo da cv. ‘Vitória’ e ‘Imperial’, novas fontes potenciais de obtenção de bromelina podem ser explorados no intuito de avaliar concentrações e rendimento da bromelina (VENTURA et al., 2009).

Diante disto, foi proposto nesse trabalho explorar aspectos que pudessem gerar agregação de valor ao agronegócio do abacaxizeiro e reconhecimento científico através da quantificação dos compostos fenólicos, avaliação da atividade antioxidante, enzimática, proteolítica e específica da bromelina em extratos de polpa, talo, casca e coroa de três cultivares de abacaxizeiros procedentes de diferentes regiões da Paraíba, com a perspectiva de uma utilização mais ampla desta fruta do ponto de vista tecnológico e nutricional, agregando valor às porções comestíveis bem como os resíduos gerados do consumo e industrialização.

2. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização da qualidade e do perfil bioquímico de porções do abacaxi a partir de extratos de polpa, talo, casca e coroa de três cultivares distintas de abacaxizeiro.

2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar características físicas e físico-químicas de infrutescências de abacaxizeiros das cultivares ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante em extratos de polpa, talo, casca e coroa destes cultivares de abacaxi;
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ácido ascorbato peroxidase (APX), em extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Determinar o teor de proteínas totais, atividade proteolítica e atividade específica de bromelina nos extratos de polpa, talo, casca e coroa das infrutescências de abacaxizeiros das cultivares ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Quantificar a atividade da bromelina em extratos de polpa, talo, casca e coroa das infrutescências de abacaxizeiros das cultivares ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Obter o perfil de moléculas de proteínas através de técnicas de eletroforese de SDS-PAGE;
- ✓ Interrelacionar as diferenças entre os extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’ de modo a identificar as características que influenciam na variabilidade destas cultivares.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A. M.; GUO, X.; FU, X.; ZHOU, L.; CHEN, Y.; ZHU, Y.; YAN, H. LIU, R. H. Comparative Assessment of Phenolic Content and in Vitro Antioxidant Capacity in the Pulp and Peel of Mango Cultivars. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 13507-13527, 2015.

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 480 p. 2015.

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, Â. M. C.; PRADO, G. M.; CARVALHO MAGALHÃES, C. E.; MAIA, G. A.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.

BI, X.; Zhang, J.; Chen, C.; Zhang, D.; Li, P.; Ma, F. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food chemistry*, v. 152, p. 205-209, 2014.

FAOSTAT, FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2016.

HEBBAR, H. U., SUMANA, B., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 4896-4902, 2008.

HEBBAR, H. U.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4896–4902, 2008.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R.; FERREIRA, I. C. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, v. 173, p. 501-513, 2015.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Ed. 40. Rio de Janeiro: IBGE, 2013.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1821- 1835, 2011.

LIMA, R. P., SILVA, S. M., DANTAS, R. L., DANTAS, A. L., SOUSA, A. S. B., PEREIRA, W. E., MENDONÇA, R. M. N. Use of Digital Image Processing for Evaluation of Translucency in Fresh Cut ‘Pérola’ Pineapple Coated with Biofilms. In: **III International Conference on Fresh-cut Produce: Maintaining Quality & Safety**, September 13-18, 2015.

QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, v. 68, n. 1, p. 125-131, 2013.

RAIMBAULT, A. K., MARIE-ALPHONSINE, P. A., HORRY, J. P., FRANCOISHAUGRIN, M., ROMUALD, K., & SOLER, A. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 1, p. 342-348, 2010.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; NANDAKUMAR, N.; PALANISWAMI, R.; NISHIGAKI, Y.; NISHIGAKI, I. . Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, v. 86, p. 103-112, 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SILVA, D. F. P.; SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, C. S. SALOMÃO, L. C. C.; STRUIVING, T. B. Caracterização de frutos de 15 cultivares de mangueira na Zona da Mata mineira. **Ceres**, v. 56, n. 6, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTOS S. A.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

TANG, K. C. S.; KONCZAK, I.; ZHAO, J.. Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). *Food chemistry*, v. 192, p. 698-705, 2016.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; CAETANO L. C. S. Abacaxi 'Vitória': uma cultivar resistente à fusariose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, 2009.

VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro, in: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., MONTEIRO, A.J.A., COSTA, H. (Eds.), Controle de doenças de plantas fruteiras. Federal University of Viçosa, Viçosa, pp. 445 – 510, 2002.

CAPÍTULO I

Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio e atividade da bromelina em plantas

Revisão Bibliográfica

BARROS, T. F. S. **Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio e atividade da bromelina em plantas.** Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Trabalho de Tese em Agronomia. Orientadora: Profª. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

RESUMO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma fruta das regiões tropicais e subtropicais, com ampla aceitação no mercado consumidor, tanto ao natural quanto na forma de produtos industrializados. Este fruto é extensivamente cultivado em diversos países, e no Brasil assume grande importância econômica. A produção brasileira de abacaxis na safra de 2015 atingiu 1.767.267 mil frutos, em uma área plantada de 103.233 hectares, apresentando um rendimento médio de 29.986 frutos por hectare, entretanto, do abacaxizeiro apenas o fruto é comercializado, sendo as cascas, talos, coroa e folhas considerados resíduos pelas indústrias de sucos e conservas. Estes resíduos constituem fontes importantes de enzimas proteolíticas, a exemplo da bromelina, que vem despertando expressivo interesse científico. A bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família da Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido (NADIZARAH et al., 2014). É uma protease com relevância na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e biotecnológica, de alto valor comercial, que pode ser obtida a partir de resíduos do abacaxizeiro. No entanto, as condições de estresse biótico e abiótico impostas às plantas induzem a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo causar danos às estruturas celulares e mesmo acarretar a morte da planta. As respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas superiores ao estresse oxidativo incluem um eficiente sistema de defesa antioxidativo, que envolve a atividade de enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peroxirredoxinas, dentre outras, além de metabólitos não enzimáticos, que, de forma conjunta, atuam na eliminação da ROS e na redução do dano oxidativo. Nesta revisão, serão abordados os principais sítios de produção de ROS, a ação de algumas enzimas do sistema de defesa antioxidante em plantas, e o uso de enzimas com aplicação industrial e terapêutica.

Palavras-chave: ROS, radical superóxido, enzimas antioxidantes, bromelina.

BARROS, T. F. S. **Generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species and bromelain activity in plants.** Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Trabalho de Tese em Agronomia. Orientadora: Profª. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) is a fruit from tropical and subtropical regions, with wide acceptance in the consumer market, both in the natural and in the form of industrialized products. This fruit is extensively cultivated in several countries, and in Brazil it assumes great economic importance. The Brazilian production of pineapples in the harvest of 2015 reached 1,767,267 thousand fruits, in a planted area of 103,233 hectares, presenting an average yield of 29,986 fruits per hectare, however, of the pineapple only the fruit is commercialized, being the barks, Crown and leaves considered waste by the juice and canning industries. These residues are important sources of proteolytic enzymes, such as bromelain, which has aroused significant scientific interest. Bromelain is the generic name given to the set of proteolytic enzymes found in plants of the Bromeliaceae family, of which pineapple is the best known (NADIZARAH et al., 2014). It is a protease with relevance in the food, cosmetic, pharmaceutical and biotechnological industry, of high commercial value, that can be obtained from residues of pineapple. However, the conditions of biotic and abiotic stress imposed on the plants induce the overproduction of reactive oxygen species (ROS), which can cause damage to the cellular structures and even cause death of the plant. The biochemical and physiological responses of plants superior to oxidative stress include an efficient antioxidative defense system, which involves the activity of enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, peroxiredoxins, among others, besides non-enzymatic metabolites, which, together, Act to eliminate ROS and reduce oxidative damage. In this review, the main production sites of ROS, the action of some enzymes of the antioxidant defense system in plants, and the use of enzymes with industrial and therapeutic application will be discussed.

Key words: ROS, superoxide radical, antioxidant enzymes, bromelain.

INTRODUÇÃO

1. Abacaxicultura

A cultura do abacaxi é considerada uma atividade economicamente viável e de relevância social nas regiões de exploração. Nos últimos anos, vem galgando patamares expressivos de consumo e a sua ampla aceitação pode ser atribuída as excelentes características sensoriais dos frutos. No cenário mundial, o Brasil é o segundo maior produtor de abacaxi, com produção de aproximadamente 1,7 milhão de infrutescências e produtividade de 25,6 t ha⁻¹ (FAOSTAT, 2016). O estado da Paraíba é o segundo maior produtor nacional, apresentando 283.362 t, que corresponde a 16,13% da produção nacional (IBGE, 2017). Entretanto, as regiões produtoras do estado da PB estão concentradas nas microrregiões litorâneas, em áreas de Tabuleiros Costeiros, que enfrentam adversidades edafoclimáticas, como solos com baixa fertilidade natural e baixos níveis tecnológicos na cadeia produtiva. Além disso, a produção de abacaxizeiro corresponde ao cultivo de quase 100% das áreas comerciais com a cv. Pérola, que é a mais difundida nas regiões Norte e Nordeste (Reinhardt et al., 2002).

A cultivar Pérola têm boas características organolépticas, sendo os mais apreciados para o consumo in natura, porém sendo menos adequados para a indústria. A planta possui porte médio e crescimento ereto; é vigorosa, com folhas com cerca de 65 cm de comprimento e espinhos nas bordas. O pedúnculo do fruto é longo (em torno de 30 cm). Produz muitos filhotes (5 a 15) presos aos pedúnculos, próximos da base do fruto, o qual apresenta forma cônica, casca amarelada (quando maduro), polpa branca, sucosa, com sólidos solúveis totais de 14 ° Brix a 16 ° Brix, pouca acidez, sendo agradável ao paladar do brasileiro. O fruto pesa de 1,0 kg a 1,5 kg, possui coroa grande e tem sido pouco utilizado para a exportação in natura e industrialização sob forma de rodela. Apresenta suscetibilidade a fusariose que pode causar perdas estimadas de 30 a 40% dos frutos (Ventura et al., 2009).

A introdução de novas cultivares de abacaxizeiro resistente a fusariose, como a cv. Vitória e a cv. Imperial pode ser promissora para o Estado da Paraíba, pois permitirá a diversificação do sistema de produção. A cultivar de abacaxi BRS Vitória apresenta formato cilíndrico, folha de cor verde claro, sem espinhos nas bordas. Sua casca apresenta cor amarela na maturação. O fruto tem polpa branca, com elevado teor de açúcares e excelente sabor nas análises químicas e sensoriais, sugerindo que suas características relativas à acidez (0,8%) são superiores às do abacaxi 'Pérola', tendo

ainda uma maior resistência ao transporte e em pós-colheita, o que pode facilitar a sua adoção pelos produtores e ter a preferência dos consumidores. Apresenta peso médio do fruto sem coroa de 1.427g. Os frutos obtidos podem ser destinados ao mercado de consumo in natura e para a agroindústria. Esta cultivar é um híbrido resultante do cruzamento da cv. Primavera com a cv. Smooth Cayenne.

A cultivar de abacaxi BRS Imperial é indicada para plantio em regiões adequadas à abacaxicultura, especialmente onde a fusariose é fator limitante para a produção. A planta tem porte médio e apresenta folha de cor verde escuro, sem espinhos nas bordas. Em relação ao fruto, apresenta grande aceitação dos consumidores devido às excelentes características, o fruto é pequeno, cilíndrico, casca de cor amarela na maturação. A polpa é amarela, com elevado teor de açúcar e acidez titulável moderada. Apresenta peso médio do fruto sem a coroa de 1.672g e tamanho médio de 18,5 cm. Tem por diferencial as folhas completamente lisas e resistência ao escurecimento interno do fruto. Esta característica contribui para que o abacaxi Imperial seja uma cultivar mais adequada para a exportação e tenha boa aceitação no mercado internacional. Os frutos obtidos podem ser destinados para o mercado de consumo in natura e para a industrialização. A referida cultivar foi obtida do cruzamento do abacaxi ‘Perolera’ com o abacaxi ‘Smooth Cayenne’, pela EMBRAPA/CNPMP (EMBRAPA, 2016). Desta forma, a diversificação resultante da introdução de novos cultivares no Estado possibilitará a ampliação de mercado, com geração de renda e elevação da qualidade de vida dos agricultores familiares. A utilização de cultivares resistentes, principalmente a fusariose, pode contribuir para reduzir os custos de produção, com menor exposição dos trabalhadores rurais e consumidores aos produtos químicos e redução da poluição ambiental, além de reduzir as perdas de pós-colheita, portanto, faz-se necessário estudos que permitam a consolidação de informações quanto à sua qualidade e potencial funcional.

2. Geração e Desintoxicação Enzimática de Espécies Reativas de Oxigênio em Plantas

O oxigênio molecular (O_2) surgiu na atmosfera terrestre há bilhões de anos e sua presença permite que os organismos aeróbios o utilizem como aceptor de elétron terminal durante a respiração celular, que proporciona um rendimento de energia superior ao da fermentação. Embora necessário para o desempenho das funções

celulares, o O_2 leva, inevitavelmente, à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) em eventos metabólicos que ocorrem, principalmente, nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar a citotoxicidade das ROS. O sistema celular de defesa antioxidante se inicia com uma cascata enzimática, mas envolve também componentes não enzimáticos, dentre os quais se destacam o ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), o β -caroteno e o α -tocoferol. Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (SERKEDJIEVA, 2011). Contudo, o equilíbrio entre a produção e a neutralização pode ser alterado, aumentando significativamente os níveis intracelulares de ROS, ocasionando o estresse oxidativo (APEL & HIRT, 2004). A regulação da expressão de genes codificantes de enzimas antioxidantes, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas ROS, faz parte da resposta a esse estresse (CYRNE et al., 2003).

2.1 Formação de ROS a partir do oxigênio molecular

ROS são normalmente referidas como subprodutos de reações redox (KOVALCHUK, 2010) que se apresentam tanto como radicais livres, como na forma molecular de um não radical. Essas moléculas podem ser geradas como resultado de excitação, formando oxigênio singlete (1O_2), ou de sucessivas adições de elétrons ao O_2 , reduzindo-o ao radical aniônico superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}) (D'AUTRÉAUX & TOLEDANO, 2007; BHATTACHARJEE, 2010). No estado fundamental, o oxigênio é um triplete (3O_2) com dois elétrons não pareados, de mesmo spin, em diferentes orbitais. A ativação e rotação de um dos elétrons desemparelhados podem ser revertidas por excitação e formar 1O_2 (LIMA & ABDALLA, 2001; KOVALCHUK, 2010).

Ao contrário da maioria das moléculas, o estado singlete do O_2 tem maior energia do que o triplete. Assim, os dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital conferem ao 1O_2 uma energia de 22,5kcal acima daquela do estado fundamental e um tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente 10^{-6} s, muito curto. Apesar de ser menos reativo do que o radical OH^{\bullet} , o 1O_2 é mais reativo do que o $O_2^{\bullet-}$ e o

H₂O₂, e foi considerado durante muitos anos como uma molécula altamente tóxica com difusão muito limitada. Trabalhos recentes têm demonstrado que o ¹O₂ pode se difundir a distâncias significativas a partir do seu sítio de produção e que nas plantas superiores a peroxidação lipídica nos cloroplastos é, quase exclusivamente, decorrente da ação do ¹O₂ (TRANTAPHYLIDES & HAVAUX, 2009). O ¹O₂ pode ser extinto de duas formas: transferindo sua energia de excitação para outras moléculas, e retornando ao estado fundamental (*quenching* físico) ou por reações de oxidação (*quenching* químico) com outras moléculas, como lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos, causando danos às células (RONSEIN et al., 2006; TRIANTAPHYLIDÈS & HAVAUX, 2009).

O radical superóxido (O₂^{•-}) é moderadamente reativo e considerado instável por possuir número ímpar de elétrons (13) na última camada eletrônica. Em pH fisiológico tem meia-vida de 2-4μs. O O₂^{•-} se forma a partir da redução do O₂ por um único elétron. Reduções univalentes subsequentes convertem o O₂ em H₂O₂ e H₂O, em um processo denominado de redução tetravalente do oxigênio. Uma vez protonado, o O₂^{•-} forma o radical peroxila (HO₂[•]), uma ROS mais reativa que o próprio O₂^{•-}, mas presente em pequenas proporções a pH fisiológico (pH 4,8, prevalece a presença de O₂^{•-}). A dismutação do O₂^{•-} a H₂O₂ é muito rápida e pode ocorrer tanto de forma espontânea como catalizada pela enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (BHATTACHARJEE, 2010). O O₂^{•-} pode doar elétrons ao Fe³⁺ formando Fe²⁺ que, por sua vez, reduz o H₂O₂ e forma OH[•] e OH⁻. O conjunto de reações através das quais o O₂^{•-}, o H₂O₂ e o Fe²⁺ rapidamente geram OH[•] é conhecido como “reação de Haber-Weiss”, enquanto que a reação final, a oxidação do H₂O₂ pelo Fe²⁺, é denominada reação de Fenton (GIL & TUTEJA, 2010). Essas reações podem ocorrer na presença dos íons ferro ou cobre (BARTOSZ, 1997; BHATTACHARJEE, 2010). O O₂^{•-} pode reduzir quinonas e metais de transição como cobre e ferro, afetando a atividade de enzimas que contêm metal (LOCATO et al., 2010). Devido a sua limitada capacidade de difusão e à rápida dismutação não enzimática em solução aquosa, o aumento na concentração de O₂^{•-} provavelmente é comunicado ao núcleo por meio de mensageiros secundários (MYLONA & POLIDOROS, 2010).

O H₂O₂ é uma ROS moderadamente reativa com uma meia-vida relativamente longa (1 ms) e cujo pequeno tamanho permite-lhe atravessar membranas celulares e migrar para compartimentos diferentes. Dessa forma, difunde os danos entre esses compartimentos e também atua como um mensageiro da condição de estresse. Portanto,

o H_2O_2 tem uma ação deletéria, porque participa da reação formadora de OH, o oxidante mais reativo na família das ROS. Além disso, o H_2O_2 é capaz de inativar enzimas por oxidação de seus grupos tiol (GADJEV et al., 2008; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

O radical OH^\bullet é considerado a mais oxidante dentre as ROS e sua alta reatividade resulta em reações rápidas e inespecíficas com distintos substratos, podendo potencialmente reagir com todos os tipos de moléculas biológicas (AGUIAR & FERRAZ, 2007; MYLONA & POLIDOROS, 2010). Em sistemas biológicos, pode ocasionar modificações nas bases nitrogenadas, levando à inativação ou mutação do DNA; desnaturar proteínas pela oxidação de grupos sulfidril (-SH) e pontes dissulfeto (-SS), além de causar danos a moléculas de carboidratos e retirar átomos de hidrogênio de grupos metílicos de ácidos graxos poli-insaturados, dando início à peroxidação lipídica (BLOKHINA et al., 2003; BARREIROS, 2006). Devido à alta reatividade e curta meia-vida, não há registro de sistema gênicos ativados pelo OH^\bullet . Existem, porém, evidências de seu papel regulatório no crescimento radicular e alongação foliar, bem como no afrouxamento da parede celular, possivelmente decorrente da degradação de polissacarídeos, induzida pelo OH^\bullet (MYLONA & POLIDOROS, 2010; FAURE et al., 2012).

2.2 Geração de ROS em processos metabólicos celulares

Os processos metabólicos dependentes do oxigênio, como a respiração aeróbica, fotossíntese e fotorrespiração, levam à produção de ROS em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, respectivamente. Cloroplastos e mitocôndrias são verdadeiras “casas-de-força” das células fotossintéticas. Nessas organelas, as cadeias transportadoras de elétrons (CTE) não são apenas a força motriz do metabolismo celular, mas geradoras de sinais redox, que participam e regulam processos biológicos das plantas, mediante a formação de ROS (FOYER & NOCTOR, 2003). A fotorrespiração é, sem dúvida, a principal fonte de H_2O_2 em células fotossintéticas. A geração peroxissomal de H_2O_2 pode servir como um mecanismo de transferência de um sinal proveniente da fotossíntese para o resto da célula (FOYER et al., 2009). Mesmo sob condições normais, a formação de H_2O_2 pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) fotossintética de plantas C3 é da ordem de $4\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e, nos peroxissomos, na via fotorrespiratória, é de $10 \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (FOYER & SHIGEOKA, 2011). Nas mitocôndrias, cloroplastos e

citosol, o H_2O_2 é gerado a partir da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela SOD. A β -oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos também gera H_2O_2 . Na membrana plasmática, o H_2O_2 é formado pela ação da NADPHoxidase (rboh) (EC 1.6.3.1) e, na matriz extracelular, várias enzimas também são fonte de H_2O_2 (MYLONA & POLIDOROS, 2010). O sistema fotossintético absorve grande quantidade de energia luminosa nos tilacóides para convertê-la em energia química. No Fotossistema II (PS-II), a formação de $^1\text{O}_2$ ocorre quando a energia armazenada na clorofila em seu estado tripleto não é dissipada, sendo então transferida para o O_2 (BHATTACHARJEE, 2010). Uma característica chave do PS-II é sua vulnerabilidade a danos induzidos pela luz, que é considerada uma consequência da produção de $^1\text{O}_2$ no centro de reação, que leva à oxidação irreversível da proteína D1 (VASS & CSER, 2009). Essa sensibilidade exige que o centro de reação do PS-II seja reconstruído, aproximadamente, a cada 30 min, mesmo sob irradiâncias relativamente baixas. O processo de reparação de danos, entretanto, ocorre em todas as intensidades de luz (FOYER & SHIGEOKA, 2011; FOYER et al, 2012).

A formação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante a fotossíntese acontece na CTE, no lado acceptor de PS-I (Figura 1). A fotorredução do O_2 em $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi descoberta há pouco mais de meio século, 1951, por Mehler, e é conhecida como “Reação de Mehler” ou fluxo pseudocíclico de elétrons. Apesar de geração de ROS, esse fluxo de elétrons evita que moléculas da CTE da fotossíntese mantenham-se em estado reduzido e produz sinais oxidativos que regulam a expressão gênica (FOYER & NOCTOR, 2009; FOYER et al., 2012). A geração do $\text{O}_2^{\bullet-}$ nos cloroplastos também pode ser induzida pela baixa concentração de CO_2 , em função do fechamento dos estômatos, resultante de condições de estresse como déficit hídrico, salinidade ou temperatura elevada (DABROWSKA et al., 2007). A limitação da fixação de CO_2 no ciclo de Calvin em plantas sob tais condições diminui a oxidação do NADPH. Quando isso ocorre, o elétron da ferredoxina reduzida que seria transferido para o NADP vai para o O_2 e forma $\text{O}_2^{\bullet-}$ (AHMAD et al., 2008). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também é produzido nos peroxissomos, citosol e no espaço apoplástico (MYLONA & POLIDOROS, 2010).

A produção de ROS nas mitocôndrias de plantas recebeu pouca atenção no passado (BREUSEGEM et al., 2001), mas dados mais recentes sugerem que tais organelas podem ser fontes de ROS sob condições de estresse específicos. Nas células heterotróficas, as mitocôndrias são as principais geradoras de ROS, mas, nas células fotossintezantes, é provável que respondam por uma pequena parte da produção de ROS em geral (NOCTOR, 2008). As oxidases alternativas (AOX, EC 1.10.3.11) catalisam a

redução tetravalente do oxigênio à água, mas a redução univalente a $O_2^{\bullet -}$ ocorre em vários outros locais da CTE. Segundo MITTLER (2002), uma pequena parcela dos elétrons escapa da CTE respiratória nos complexos I e III, levando à produção de $O_2^{\bullet -}$ (Figura 1). Outras ROS são formadas pela mesma via nas mitocôndrias, incluindo H_2O_2 e OH^{\bullet} . Estudos revelam que a ubiquinona é uma das principais geradoras de H_2O_2 na CTE mitocondrial. Uma potencial sequência de super-redução da ubiquinona pode levar à produção do $O_2^{\bullet -}$ e do OH^{\bullet} na CTE mitocondrial, caso o nível de ADP esteja muito baixo e a rota principal de elétrons esteja saturada (HELDT & HELDT, 2005a; BHATTACHARJEE, 2010). A extensão da produção fisiológica de 1O_2 pelas mitocôndrias não é clara, embora a fonte potencial seja a foto-sensibilização de precursores heme ou produtos de degradação (NOCTOR, 2008).

Os peroxissomos são organelas que realizam reações de oxidação de substratos orgânicos, resultando na produção de H_2O_2 e são considerados os principais sítios intracelulares de geração dessas ROSs (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). A geração fotorrespiratória de H_2O_2 ocorre como subproduto da oxidação do grupo alcólico do glicolato (FOYER et al., 2009). Nas folhas, a produção de H_2O_2 nos peroxissomos e cloroplastos pode ser de 30 a 100 vezes mais rápida do que nas mitocôndrias (FOYER & NOCTOR, 2003; BHATTACHARJEE, 2010). Estudos sobre a participação dos peroxissomos na formação de ROS durante a fotorrespiração e a senescência têm demonstrado a existência de dois sítios geradores de ROS nessas organelas: a matriz e a membrana peroxissomal. Na matriz, atua a xantina oxidase (XOD, EC 1.1.3.22), que catalisa a oxidação da xantina a ácido úrico e superóxido e é considerada uma via de formação de $O_2^{\bullet -}$. Por sua vez, na membrana peroxissomal, uma pequena CTE parece estar envolvida na produção de $O_2^{\bullet -}$ (DEL RÍO et al., 2009).

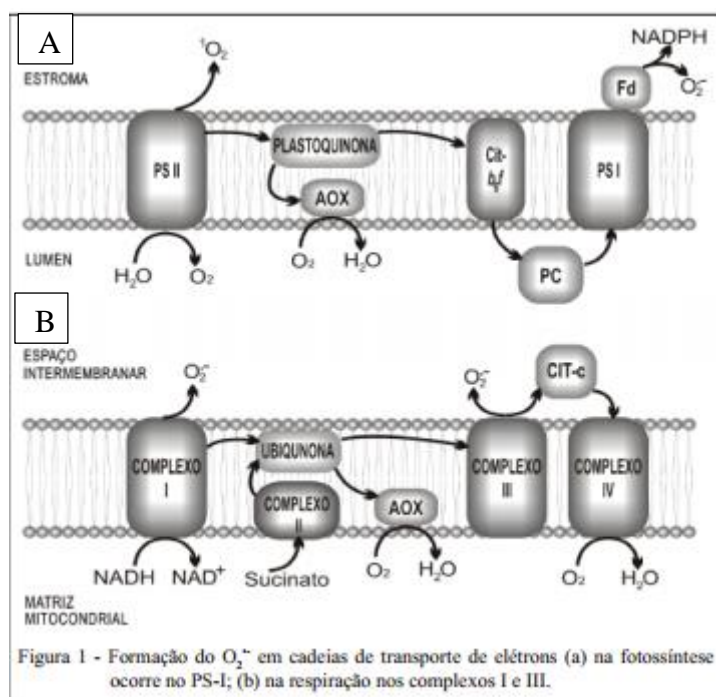


Figura 1: Formação do $O_2^{\cdot -}$ em cadeias de transporte de elétrons (a) na fotossíntese ocorre no PS-I; (b) na respiração nos complexos I e III.

2.3 Mecanismo de defesa por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

Os processos metabólicos envolvem um sistema de óxido-redução em todos os organismos vivos. Os processos anabólicos, redutores, são utilizados para síntese orgânica e armazenamento de energia, enquanto o catabolismo reúne processos oxidativos para liberação de energia metabólica (FOYER & NOCTOR, 2003). Como discutido anteriormente, tanto nas vias de síntese como de oxidação de moléculas biológicas, ocorre à formação de ROS nas estruturas subcelulares. Quando sob estresse ambiental e o equilíbrio entre a produção de ROS e a atividade antioxidante é rompido a favor dos compostos oxidantes, ocorrem danos oxidativos nas estruturas celulares (KIM & KWAK, 2010). A capacidade de acionar mecanismos de defesa antioxidantes pode prevenir o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo extremo (BHATTACHARJEE, 2010). Os sistemas de defesa antioxidantes das plantas envolvem agentes enzimáticos e não enzimáticos (MITTLER, 2002; KIM & KWAK, 2010). Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas e mediam praticamente toda a enorme variedade de reações bioquímicas que constituem a vida, portanto, são essenciais para a manutenção adequada de qualquer organismo. As enzimas antioxidantes estão presentes em diferentes compartimentos celulares e contribuem para o controle das ROS em plantas, o que confere um estágio de homeostase redox no

sistema. Destacam-se entre as enzimas antioxidantes a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1), glutathione redutase (GR, EC1.6.4.2), peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1). Entre os principais metabólitos antioxidantes, encontram-se o ácido ascórbico (AsA), a glutathione (GSH), o α -tocoferol e os carotenóides. Todos esses ocorrem em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (MITTLER, 2002; KIM & KWAK, 2010; DINAKAR et al., 2012).

O ácido ascórbico (AsA) é um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos e pode inativar várias ROS. Juntamente com a GSH, participa do Ciclo do Ascorbato-Glutathione, no qual o H_2O_2 é eliminado pela APX mediante a peroxidação do AsA. A recuperação do AsA ocorre por meio da oxidação da GSH que torna a ser reduzida pela glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2)(DINAKAR et al 2012). A GSH é o principal composto tiol na maioria das plantas e também atua como antioxidante (DELAPLACE et al., 2011). O α -tocoferol e os carotenóides sequestram o 1O_2 produzido nas membranas tilacóides pelo PSII. Os carotenóides agem como um filtro da luz visível e UV e reduzem os danos celulares causados pela luz. O α -tocoferol já teve os genes de sua rota biossintética em plantas identificados. São moléculas lipossolúveis sintetizadas apenas por organismos fotossintetizantes. Vários fatores de estresse abiótico promovem o aumento do teor de α -tocoferol e as pesquisas têm demonstrado que ele atua na proteção dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) contra a peroxidação dos lipídios de membrana pelas ROS (MAEDA & DELLAPENNA, 2007).

As superóxido desmutases (SODs) são metalo-enzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as ROS e que catalisam a dismutação de dois radicais $O_2^{\bullet-}$, gerando H_2O_2 e O_2 . Essas enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010). Uma vez que dismutam o $O_2^{\bullet-}$, agem indiretamente na redução do risco de formação do OH^{\bullet} a partir do $O_2^{\bullet-}$ (DUBEY, 2011; DINAKAR et al., 2012). São classificadas de acordo com seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/ZnSOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (GILL & TUJETA, 2010). Em geral, as plantas contêm uma Mn-SOD localizada na matriz mitocondrial e uma Cu/Zn-SOD citosólica, com Fe-SOD e/ou Cu/ZnSOD, presentes no estroma do cloroplasto. O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia muito de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada enzima (BOWLER et al., 1992).

A catalase (CAT) é uma das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos. Atua nos peroxissomos e glioxissomos e pode ser encontrada também em mitocôndrias. Ela converte duas moléculas de H_2O_2 a H_2O e oxigênio molecular (HELDT & HELDT, 2005c; DUBEY, 2011). As plantas possuem várias isoformas de CAT, as quais podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (BREUSEGEM et al., 2001). A catalase e o ciclo do ascorbato-glutationa são importantes na eliminação do H_2O_2 e, apesar de suas propriedades e requisitos serem diferentes, podem funcionar efetivamente em paralelo. Como a CAT opera sem agente redutor, ela fornece às plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do H_2O_2 (SHARMA et al., 2012). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 (mM), por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de ROS, especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (DUBEY, 2011). Assim, a APX e a CAT são as duas enzimas mais importantes dentre os componentes de desintoxicação do H_2O_2 (BHATT & TRIPATHI, 2011). A ação da CAT e das peroxidases destaca a diferença básica entre as duas principais rotas metabólicas do H_2O_2 nas células. Nesse sentido, a remoção de H_2O_2 por peroxidases requer uma pequena molécula redutora (ou proteínas como o citocromo c ou tioredoxina) para agir como um co-fator de regeneração e não leva à evolução de O_2 , porque a água é o produto da reação (MHAMDI et al., 2012).

A ácido ascórbico peroxidase (APX) é uma heme-proteína, da Classe I da superfamília das peroxidases, com distintas formas isoenzimáticas, diversamente reguladas. Suas isoformas podem ser encontradas no citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos (estroma e ligadas às membranas dos tilacoides) e parede celular (DABROWSKA et al., 2007; De GARA, 2004). A APX exige o ácido ascórbico como redutor, tem alta afinidade com o H_2O_2 , com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) na ordem de μM , permitindo a eliminação do H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (LOCATO et al., 2010; SHARMA et al., 2012). Nos cloroplastos e mitocôndrias a APX atua no ciclo ascorbato-glutationa, no qual o H_2O_2 formado pela ação da SOD é reduzido pelo ascorbato (MITTLER, 2002; LOCATO et al., 2010). Nos cloroplastos a fotorredução do oxigênio à água pode gerar $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , que são eliminados pela ação da SOD e da APX, respectivamente (ASADA, 2006).

As peroxidases (PODs) utilizam o H_2O_2 como oxidante e compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons. Dessa forma, o H_2O_2 formado pela ação da SOD também pode ser eliminado pelas PODs, além da CAT e APX (LOCATO et al., 2010). As PODs localizam-se principalmente na parede celular e no vacúolo. Sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores bióticos e abióticos, bem como na identificação precoce de processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas (LIMA et al., 2002; PIZA et al., 2003; LOCATO, 2010; KIM & KWAN, 2010). Nas plantas, as PODs existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares. Algumas PODs são constitutivamente expressas, enquanto outras são induzidas por estresses ambientais, como constatado em estudos em que baixas atividades mostram sintomas de estresse menos graves e as altas, sintomas mais graves.

APXs e PODs não são as únicas peroxidases das células vegetais. As peroxirredoxinas (Prx) e a peroxidase da glutathione (GPx) têm recebido atenção especial recentemente. As Prx são tiol-peroxidases que catalisam a desintoxicação do H_2O_2 e outros peróxidos. As Prx, diferentemente das PODs e APXs, não têm cofatores redox como grupos prostético com um íon metálico, normalmente necessário para a reação catalítica ocorrer. Dessa forma, durante a redução do H_2O_2 , sofrem oxidação que as torna inativas. Como lhes faltam cofatores redox, dependem de redutores ou doadores de elétrons externos para sua regeneração subsequente no ciclo catalítico. De acordo com as diferentes subclasses de Prx, uma ampla gama de doadores de elétrons ou redutores são responsáveis por sua regeneração, incluindo-se NADPH ou NADH e diferentes proteínas, como a tioredoxina (Trx), a glutaredoxina (Grx) (BHATT & TRIPATHI, 2011). O OH^\bullet é uma molécula altamente nociva em sistemas vivos. Por isso a sua formação pela redução de íons metálicos na presença do $\text{O}_2^{\bullet-}$ deve ser evitada. As enzimas do sistema antioxidante não eliminam o OH^\bullet diretamente, de modo que a regulação de seus precursores, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , é o passo fundamental na prevenção dos riscos do OH^\bullet , reunindo, portanto, a ação das enzimas SOD, APX e CAT (BHATTACHARJEE, 2010; MYLONA & POLIDOROS, 2010).

Neste contexto, os sistemas antioxidantes são mecanismos para que as plantas minimizem os efeitos de ROS e mantenham o estado redox fisiológico. Diferentes classes de enzimas antioxidantes catalisam reações de oxirredução, muitas vezes dependentes de elétrons fornecidos por redutores de baixo peso molecular, como ácido ascórbico e compostos fenólicos (NOCTOR et al., 2014; LATA, 2015). As enzimas

superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POD) e as enzimas do ciclo ácido ascórbico-glutationa como a ácido ascórbico peroxidase (APX), e glutathione reductase (GR), atuam como parte do sistema de defesa antioxidante enzimático (WU et al., 2010; NOCTOR et al., 2014; DEVI e GIRIDHAR, 2015; LIN et al., 2015). Por sua vez, os compostos fenólicos, o ácido ascórbico e a glutathione são moléculas de elevada capacidade redutora, que atuam diretamente no sistema antioxidante não enzimático (ALOTHMAN et al., 2009; HOSSAIN et al., 2011).

Ambos os sistemas antioxidantes, contribuem para a eliminação do peróxido de hidrogênio com consumo reduzido de energia. Portanto, em virtude da carência de estudos que caracterizem os processos fisiológicos ligados ao metabolismo antioxidante, de controle de ROS, propõe-se avaliar a qualidade, o potencial funcional e atividade de enzimas antioxidantes em porções de infrutescências de abacaxizeiros.

3. Biotecnologia Enzimática e Mercado

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Muitas dessas reações são catalisadas quimicamente e podem ser substituídos por enzimas. As enzimas apresentam-se como grandes vantagens por serem ecologicamente mais viáveis. A cada dia presenciam-se mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de microrganismos (MONTEIRO; SILVA, 2009; COSTA, 2010).

O mercado de enzimas está dividido em dois grandes segmentos: enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa) (BON et al., 2008). Existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais. O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, só de bromelina, por exemplo, o país importou no período de janeiro a novembro de 2014 um total 1.812 Kg (1 g de bromelina \approx R\$25,00). Além disso, o país apresenta um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática e de enzimas faz-se cada vez mais necessário (MONTEIRO; SILVA, 2009; MIDIC/SECEX, 2015). Compatibilizar o desenvolvimento econômico com a proteção do meio ambiente, mediante o uso racional

dos recursos naturais, a preservação e a recuperação do meio ambiente e o controle da poluição são os objetivos centrais das novas abordagens industriais e econômicas, muitas delas utilizando a biocatálise.

Frequentemente se depara com aplicações versáteis da tecnologia enzimática em muitos setores industriais. Uma das maneiras mais ricas de analisar a evolução de um tipo de indústria e, ao mesmo tempo, observar as tendências de seu desenvolvimento futuro é por meio das informações contidas nas patentes de invenção, que guardam a evolução do estado da arte e contam a história da produção de enzimas (BON et al., 2008). A investigação e o desenvolvimento de enzimas com aplicação industrial e o seu espaço de mercado estão subdivididos em várias categorias.

As empresas produzem enzimas para bens de consumo, usadas diretamente na formulação de detergentes e produtos de limpeza, ou indiretamente, na indústria transformadora, bem como na valorização de processos na indústria têxtil, de couros, de papel e celulose, de bebidas fermentadas e produtos alimentares. As enzimas são usadas igualmente na formulação de rações animais (BON et al., 2008). Outras empresas desenvolvem sistemas industriais de conversão de biomassa para transformação enzimática de resíduos agrícolas em etanol, usando, por exemplo, o amido de milho (HARDIN, 1996). Ultimamente, verifica-se a introdução de enzimas na produção de plásticos derivados de matéria-prima não originada do petróleo, na produção de fontes alternativas de energia, como os biocombustíveis. Existem também, empresas fornecedoras de tecnologia, que detêm elevado nível de conhecimento e propriedade intelectual em micro-organismos, através de processos usando engenharia genética (BON et al., 2008).

A maior fatia de absorção de enzimas é a indústria farmacêutica (Figura 1) em que o crescimento é mantido pela substituição de terapias tradicionais por terapias enzimáticas. Espera-se para os próximos anos um crescimento significativo do mercado de novos produtos (FREEDONIA, 2002). Depois dos antibióticos, as enzimas são os produtos mais explorados na indústria de biotecnologia (OLIVEIRA et al., 2006). As numerosas aplicações industriais e terapêuticas de enzimas têm aumentado à demanda de suas produções. As proteases são enzimas consideradas mais importantes de todas as enzimas industriais, com venda anual de cerca de três bilhões de dólares (LEARY et al., 2009). Representando cerca de 60% de todas as enzimas comerciais em todo o mundo. As proteases vêm ganhando atenção única no campo da biotecnologia e da medicina, devido às suas propriedades exploráveis (químicas e terapêuticas) (BALA et al., 2012).

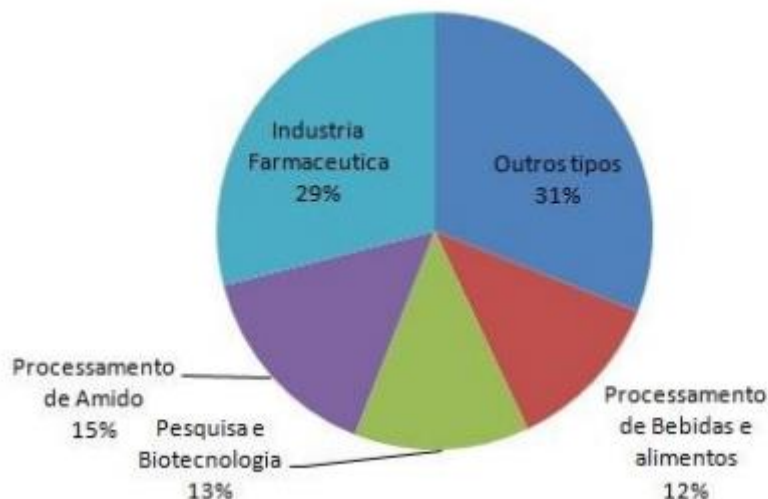


Figura 2: Distribuição da demanda de enzimas em diferentes áreas. Fonte: Monteiro; Silva (2009).

3.1 Enzimas Proteolíticas

O estudo das proteases iniciou-se no fim do século XVI motivado pelo interesse na fisiologia do sistema digestivo humano. Entretanto, já na antiguidade, tecidos animais, vegetais e outros materiais biológicos ricos em proteases eram, de forma empírica, usados no preparo de queijos e no tratamento dos couros, tendo sido as proteases as primeiras enzimas com aplicação tecnológica (BON et al., 2008). As enzimas proteolíticas, proteases ou proteinases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em fragmentos de proteínas (peptídeo e aminoácidos). Elas têm presença universal nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011). Apesar de todas terem essa característica funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade (STRYER, 1996, citado por CABRAL, 2001).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC), as peptidases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases) e a subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As peptidases (EC 3.4) que clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica são classificadas como endopeptidases, (EC 3.4.21 -99) e as que atuam nas extremidades da cadeia, de exopeptidases (E.C. 3.4.11 -19) (BON et al., 2008). As exopeptidases que atuam na região N-terminal da proteína são classificadas como aminopeptidases e as que atuam na região C-terminal são denominadas carboxipeptidases (BON et al., 2008).

Entretanto, a especificidade das proteases não se relaciona apenas à posição da ligação peptídica ou ao tamanho da cadeia de resíduos de aminoácidos, existindo também seletividade em relação à sequência de aminoácidos vizinhos à ligação. Hartley, em 1960, propôs uma classificação baseada na estrutura química do centro ativo. Segundo esta classificação as exopeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos (Tabela 1), do centro ativo envolvidos no mecanismo catalítico (BON et al., 2008).

Tabela 1: Classificação de peptidases de acordo com o sítio catalítico

Peptidases	EC Subclasses
Carboxipeptidases	
Serina-carboxipeptidase	3.4.16
Metalo-carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase	3.4.18
Endopeptidases	
Serina-endopeptidase	3.4.21
Cisteína-endopeptidase	3.4.22
Aspártico-endopeptidase	3.4.23
Metalo-endopeptidase	3.4.24
Treonina-endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

Fonte: Bon et al., 2008.

Entre as peptidases descritas, merece destaque a família das cisteíno-peptidases, que apresenta ampla distribuição nos organismos, sendo encontrados em procariotos e eucariotos. O mecanismo catalítico dessa enzima envolve um grupo cisteínico (-SH) em seu sítio ativo (DUBEY et al., 2007; GONZÁLEZ-RABADE et al., 2011; BALA et al., 2012). Na reação de hidrólise da ligação peptídica, o primeiro passo corresponde no caminho da associação (ou ligação não covalente) da enzima livre (I) com o substrato, para formar o complexo de Michaelis (II). Este passo é seguido pela acilação da enzima (III a), com a formação e liberação do primeiro produto da enzima, a amina R_1NH_2 . No passo seguinte, a acil-enzima (III b), reage com uma molécula de água para formar o segundo produto (passo da desacilação). A liberação deste produto resulta na regeneração da enzima livre (STORER et al., 1994). Acredita-se que muitos passos intermediários e ou estados de transição possam existir ao longo destes caminhos, baseado em dados experimentais e por analogia com as serino-proteases, sendo proposto que a acilação e desacilação envolve a formação de intermediários transitórios tetraédricos (TH 1 e TH2). Em adição, quatro estados de transição (TS1, TS2, TS3, e

TS4) separam o complexo de Michaelis acilenzima do complexo enzima produto dos dois intermediários tetraédricos (CABRAL, 2001) (Figura 2).

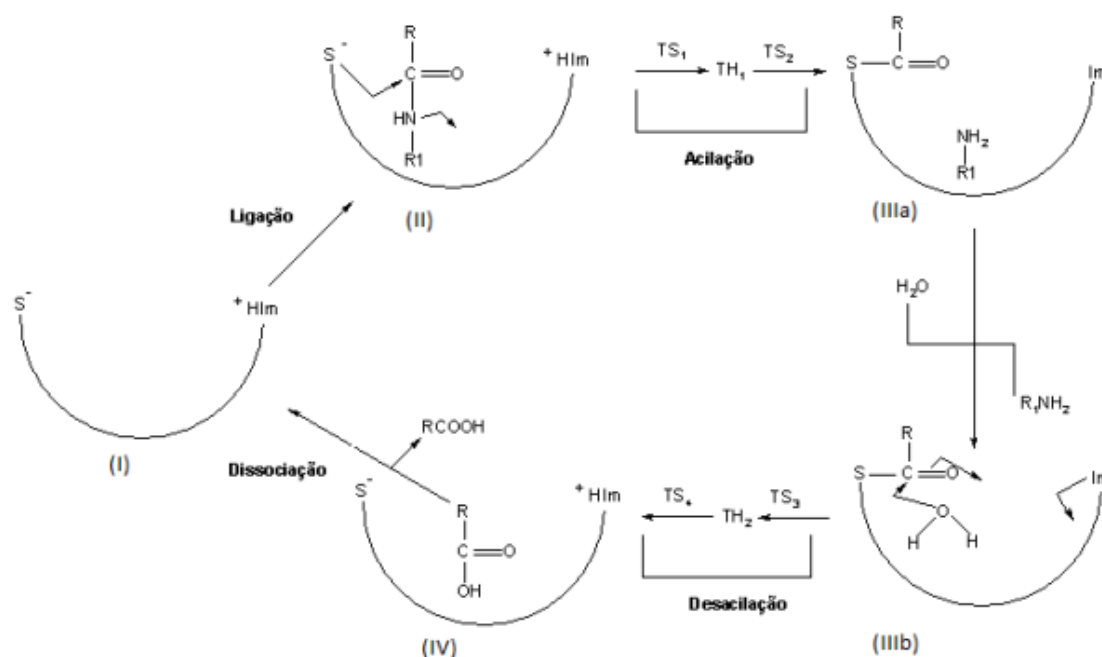


Figura 3: Representação esquemática de vários passos e supostos intermediários e estados de transições, no caminho da reação para hidrólise de um substrato amida por uma cisteíno-peptidase. Fonte: Adaptada e modificada de Cabral (2001).

As ações das peptidases são controladas por mecanismos que envolvem controle gênico, produção de zimogênios e sua ativação e inibição de enzimas (CABRAL, 2001). Em plantas acredita-se que as cisteíno peptidases estejam envolvidas com a morte celular programada durante a senescência (JUNG et al., 2008), e também em seus principais mecanismos de defesas (KONNO et al., 2004). A bromelina no abacaxi, por exemplo, tem um papel importantíssimo na senescência e no processo de amadurecimento dos frutos (NEUTEBOOM et al., 2009). A papaína no látex do mamão atua na proteção dessas plantas ao ataque de insetos herbívoros (KONNO et al., 2004). Jung et al. (2008) ao super expressar o gene da bromelina em couve chinesa notaram que, as plantas que expressavam bromelina apresentavam uma resistência a *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum*, bactéria causadora da podridão mole, doença responsável por causar sérios danos a plantas e perdas econômicas em muitas culturas tais como, cenoura, rabanete, batata e couve.

3.2 Enzimas Proteolíticas de Interesse para Biotecnologia

As enzimas proteolíticas ou proteases constituem o mais importante grupo de enzimas de interesse industrial, e compreendem cerca de 60% das enzimas utilizadas. Apresentam importância nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica e até no processamento do couro (CABRAL, 2001; COSTA et al., 2009; GONZALEZ-RÁBADE et al., 2011 ; BALA et al., 2012). A relevância biotecnológica deste grupo de enzimas, rico em diversidade estrutural e mecanismo de ação, reflete-se atualmente na importância qualitativa e quantitativa das suas aplicações como enzimas industriais e especiais (BON et al., 2008). Na indústria de alimentos, as peptidases possuem um papel de destaque porque catalisam a hidrólise de uma ligação específica em um determinado peptídeo, o que permite modificações pontuais em sistemas complexos, como os alimentos, melhorando o sabor, o aroma, a textura, a funcionalidade e a qualidade nutricional. Este processo, sem dúvida, é mais eficaz do que um processo físico ou químico que pode afetar todas as outras moléculas presentes no alimento. Alguns exemplos do uso das peptidases na modificação de alimentos incluem: a redução do sabor amargo de queijos, a substituição de gorduras e carboidratos por proteínas modificadas enzimaticamente que proporcionam propriedades organolépticas similares; a restauração das propriedades emulsificantes de proteínas da soja desnaturada pelo calor; e a redução do potencial alergênico de alimentos protéicos através da degradação de epítopos. Além disso, as peptidases podem agir sobre proteínas complexas, como as do soro de leite e a caseína, gerando peptídeos biologicamente ativos com papel significativo na manutenção da vida e prevenção de doenças, como peptídeos anti-hipertensivos que inibem a enzima conversora de angiotensina, e peptídeos que atuam na supressão do apetite pela produção de colecistoquinina, um hormônio intestinal, que produz a sensação de saciedade, agindo nos centros cerebrais de controle de apetite (BON et al., 2008). Na indústria de detergentes, as peptidases deixaram de ser simples aditivos às formulações destes produtos e passaram a ser ingredientes essenciais em consequência do melhor desempenho de lavagem e manutenção da cor dos tecidos. O interesse industrial pela engenharia de proteínas vem aumentando gradativamente, com o objetivo de obter enzimas modificadas com maior estabilidade a agentes oxidantes e em ampla faixa de pH. Além disso, as peptidases também contribuem para as formulações serem menos agressivas para o ambiente, porque diminuem o consumo de água e de energia e

reduzem a adição de solventes tóxicos, ácidos e produtos cáusticos. Por isso, as empresas apostam na substituição gradual de muitos componentes químicos pelas enzimas, resultando em produtos de maior valor agregado, pela sua qualidade e por serem produzidos por tecnologias limpas (BON et al., 2008). Na indústria farmacêutica, diversos fármacos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de inibir peptidases. O uso de enzimas como alvo quimioterápico é motivado pela distribuição ubíqua destas enzimas, sua participação em diversos processos fisiológicos em humanos e seu envolvimento em questões cruciais da interação de patógeno com seus hospedeiros (BON et al., 2008).

As cisteíno peptidases são alvo de intensa pesquisa por inúmeras companhias farmacêuticas, isto porque estão envolvidas em inúmeras funções celulares, como *turnover* de proteínas, a ativação de proenzimas, a reabsorção óssea, a apresentação e o processamento de antígenos, homeostase da epiderme e a maturação de hormônios (BON et al., 2008). As enzimas proteolíticas também podem ser utilizadas em processos de biotecnologia, tal como na extração de DNA de células de eucariotos (CABRAL, 2001). Como as proteases são fisiologicamente necessárias a todos os organismos vivos, são encontradas e podem ser obtidas a partir de diferentes fontes, tais como microrganismos, animais e plantas (RAO, 1998). Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas, devido à sua ampla diversidade bioquímica e sua suscetibilidade para manipulação genética. Podem ser utilizados, bactérias, fungos e vírus como fonte de obtenção (RAO, 1998). O número de proteases utilizadas industrialmente de origem vegetal é restrito, as principais enzimas com boa aceitação comercial são as cisteíno-proteases (CPs) e compreendem a papaína do mamão (*Carica papaya* L.), ficina do figo (*Ficus carica* L.) e bromelina do abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) (DUBEY, 2007; FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011 ; MUNTARI et al., 2012). O Brasil tem uma grande variedade de plantas cultivadas que podem constituir fontes inesgotáveis de enzimas para aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento (FATIBELLO; VIEIRA, 2002).

3.3 Bromelina: Propriedades Químicas e Bioquímicas

A Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família da Bromeliaceae, da qual o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) é o mais conhecido (MAURER, 2001 ; NADIZARAH et al.,

2013). A bromelina têm tido ampla aplicação na indústria de alimentos, mas elas podem ser utilizadas também em indicações clínicas, tais como: agentes antitumorais, modulação imune, limpeza de feridas, aumento do efeito de antibióticos, ação antiinflamatória, ação mucolítica, auxílio na digestão, aplicações em doenças cardiovasculares e circulatórias, em procedimentos cirúrgicos e ferimentos da musculatura esquelética (CABRAL, 2001; AICHELE et al., 2013). Na indústria de alimentos, a bromelina pode ser utilizada no amaciamento de carnes vermelhas, na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor de proteínas, na produção de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e isolados protéicos, na cervejaria para hidrolisar certos complexos proteínas-tanino, formados durante a fermentação, que se presentes na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando gelada (FREIMAN; SABAA, 1999).

O fruto do abacaxi é normalmente utilizado como alimento, os caules são considerados resíduos sendo assim uma boa fonte de obtenção de bromelina. Além disso, diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina tais como, folhas, talos, polpa da fruta, cascas coroas e resíduos industriais do processamento do fruto (TOCHI et al., 2008; HEBBAR et al., 2008; KETNAWA et al., 2012; NADIZARAH, 2013). A bromelina não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta, rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Esta é uma das vantagens da utilização e purificação das proteases do abacaxi (LOPES et al., 2005).

Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece (CESAR, 2005). O Brasil diferencia-se completamente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda sua produção é consumida na forma fresca, sendo a quantidade industrializada insignificante (BERTEVELLO, 2001). Uma das principais fontes de matéria prima para a extração de enzimas proteolíticas no Brasil, não seriam os subprodutos do processamento da fruta e sim os resíduos agrícolas, especialmente o caule que tem demonstrado bons resultados nos mais recentes estudos de extração e purificação de enzimas e nas aplicações terapêuticas da bromelina (CESAR, 2005).

A bromelina ficou conhecida quimicamente desde 1875 e em 1957 foi introduzida como um composto terapêutico (KELLY, 1996; PAVAN et al., 2012). A bromelina do caule apresenta um grupo sulfidrílico reativo por molécula, que é essencial para a catálise enzimática (BELITZ et al., 2009). A atividade da bromelina e das demais cisteíno-proteases, depende da presença, no sítio catalítico, de um resíduo de cisteína e outro de histidina. O imidazol de um resíduo de histidina usualmente funciona como um catalisador ácido-base, e aumenta o caráter nucleofílico dos grupos tiólico e hidroxila (Figuras 2; 3) (RAWLINGS ;BARRETT, 1994; FERSHT, 1995).

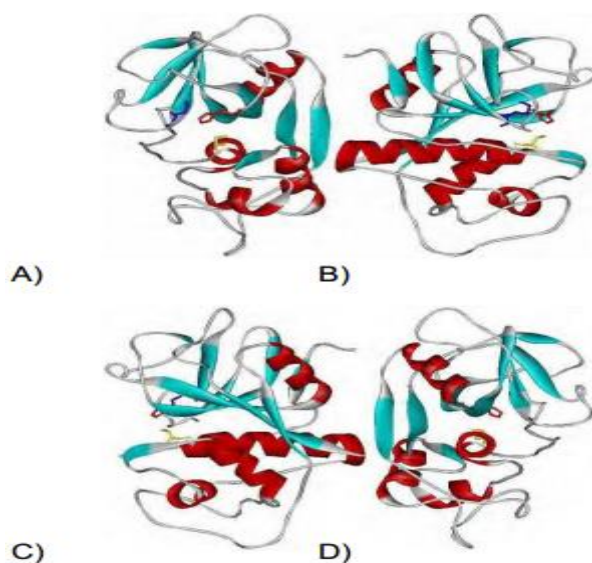


Figura 4: Estrutura terciária da bromelina do talo, utilizando como molde a papaína (9PAP). Os resíduos em destaque são referentes à tríade catalítica, estes resíduos são: Cys-26 (amarelo), His-158 (vermelho) e Lys-174 (azul). (A – Frente; B – Lado 1; C – Lado 2; D – Fundo). Fonte: Cabral (2001).

A enzima é composta por muitos aminoácidos que podem ser determinados. Além disso, é uma glicoproteína que tem um oligossacarídeo por molécula, o qual encontra-se covalentemente ligado a uma cadeia polipeptídica. Apresenta como principal resíduo aminoterminal a valina, e como resíduo carboxiterminal a glicina (Tabela 2).

Tabela 2: Composição de aminoácidos da bromelina do caule

Aminoácidos	Murachi (1964)	Ota-Y-Stein (1964)	Sfinstein Ywlitaker (1964)	Husain Lowe (1968)
Lisina	20	23	12	20,2
Histidina	1	2	1	1,34
Arginina	10	12	6	10,2
Ácido Aspártico	27	29	16	28,9
Treonina	12	14	8	12,4
Serina	24	28	16	24,9
Ácido Glutâmico	20	23	12	23,0
Prolina	13	14	8	13,1
Glicina	29	35	19	30,5
Alanina	30	35	20	32,4
Cisteína	11	10	5	7,4
Valina	19	22	12	20,7
Metionina	4	5	2	5,0
Isoleucina	20	21	12	18,4
Leucina	9	10	5	9,0
Tirosina	19	21	11	18,2
Fenilalanina	9	9	5	8,0
Triptofano	8	8	5	-
Total	(285)	(321)	(179)	-
Amônio	25	42	19	-
Glucosamina	2	6	4	-
Carboidratos	2,0	1,46	2,0	-

Média de uma análise realizada em triplicata. Fonte: Adaptada e Modificada de Fajardo (1998).

A bromelina é encontrada em toda a planta do abacaxizeiro: caule, raízes, folhas, frutos e coroa, sendo que as enzimas encontradas no caule recebem nome de bromelina do caule e tem número sistemático, de acordo com o *Enzyme Commission*, EC 3.4.22.32 (CAMPESE, 2004), anteriormente EC 3.4.22.4 (HALE, 2005). As enzimas do fruto recebem nome de bromelina do fruto e tem número sistemático EC 3.4.22.33 (CAMPESE, 2004), anteriormente 3.422.5 (HALE, 2005). A bromelina do caule é a protease mais abundante presente em extratos de abacaxi, enquanto que a maior fração presente no suco é da bromelina do fruto. Outras cisteíno-proteases também estão presentes nos extratos obtidos a partir do caule do abacaxi tais como, ananaina (EC 3.4.22.31) e comosaina (LAROCCA et al., 2010; BALA et al., 2012).

O extrato aquoso proveniente de bromelina do caule e do fruto é conhecido como o nome de bromelina. Dessa forma, bromelina compreende uma mistura de diferentes cisteíno-proteases, que apresentam sequencia de aminoácidos similares, porém distintas na atividade proteolítica quanto na sensibilidade de inativação (HALE et al., 2005; PAVAN et al., 2012). A bromelina do caule (EC 3.4.22.32) apresenta 8 componentes ativos (denominadas frações: F), sendo que F4 e F5 (aproximadamente 25

kDa) são os dois principais. A fração considerada mais ativa é a F9, que compreende 2% do total de proteínas. Foi estimado que 50% das proteínas em F4 e F5 são glicosiladas. A fração F9, no entanto, não é glicosilada e apresenta um massa molecular de aproximadamente 23 kDa (BHATTACHARYYA, 2008). O complexo de enzimas proteolíticas bromelina apresenta massa molar próxima a 31 kDa (MARTINS; NISIDA; BALDINI, 1992).

Outra proteinase que está presente em pouca quantidade inclui a bromelina da fruta (EC 3.4.22.33) a principal proteinase presente no fruto do abacaxi (HALE et al., 2005). Diversos modelos de substratos peptídicos na forma de B-(P3)-P2-P1 indicador (onde o grupo de B= bloqueador, tal como Z= benziloxycarboni ou Bz= benzoil, e P1, P2, e P3 representam aminoácidos específicos) foram usados para caracterizar a atividade proteolítica de enzimas purificadas da bromelina. A clivagem amidolítica do substrato resulta na liberação do indicador livre que pode ser detectada por fluorescência ou colorimetricamente. A bromelina do caule cliva preferencialmente o modelo de substrato Z-Arg-Arg, visto que a bromelina da fruta mostra atividade mínima contra esse substrato. Em contrapartida, a bromelina do fruto cliva eficientemente o substrato de Bz-Phe-Val-Arg (HALE et al., 2005). A atividade enzimática de bromelina compreende um amplo espectro entre 5.5 a 8 de pH e estabilidade ótima de 4,5 – 6,5. Apresenta um ponto isoelétrico (pI) de 9,55 (HERNANDEZ et al., 2005; BELITZ et al., 2009; BALA et al., 2012). A bromelina do caule é amplamente utilizada na indústria e na medicina, entretanto a bromelina do fruto não está disponível comercialmente (LAROCCA et al., 2010).

3.3.1 Massa Molecular, pH e Temperatura Ótima da Bromelina

As preparações comerciais de bromelina são avaliadas de acordo com sua atividade proteolítica, uma vez que todos os usos dessa enzima estão baseados em sua atividade, no qual são medidas as condições ótimas das reações enzimáticas (FRANCA-SANTOS et al., 2009; BALA et al., 2012). A atividade de bromelina pode ser determinada em condições ótimas de pH, e temperatura, com vários substratos, que incluem, caseína, gelatina e substratos sintéticos (BALA et al., 2012). A bromelina do caule apresenta uma massa molecular entre 23,8 e 37 kDa, pH ótimo entre 4.6 – 8.5, e temperatura ótima entre 25 – 60 ° C. Em relação a bromelina do fruto foi encontrado massa molar variando entre 24.5 – 33 kDa, pH ótimo 2,9 - 8 e temperatura ótima 37 –

70 ° C (Tabela 3) (BALA et al., 2012). Alguns fatores podem ser levados em consideração nessa divergência encontrada na literatura, tais como, o tipo de substrato utilizado no experimento de atividade, e o tempo de contato da enzima com o substrato. Por exemplo, em relação ao tipo de substrato, dependendo do substrato utilizado a enzima pode ser mais ou menos resistente a determinados valores de temperaturas o que pode influenciar na determinação da temperatura ótima (FRANÇA-SANTOS et al., 2009).

Tabela 3: Massa molecular, pH ótimo e temperatura ótima de bromelina extraído do abacaxi

Tipo de Bromelina	Massa Molar (KDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
Caule	-	7 – 8,5	-	MINAMI et al., 1971
Caule	37	7	60	SUH et al., 1992
Fruto	32,5	8	70	
Caule	-	4,6	25	HATANO et al., 1998
Caule	-	6 – 7	60	HARRACH et al., 1998
Caule	-	7	37	RASHEEDI et al., 2003
Caule	23,8	6 – 7,5	60	GUPTA et al., 2003
Caule	-	8	60	MAHMOOD et al.; 2007
Caule	-	8	60	KHATOON et al.; 2007
Fruto	24.5	-	-	LOPES et al.; 2009
Caule	26	-	-	XUE et al.; 2010
Caule	-	7	55	KETNAWA et al.; 2010
Fruto	-	-	40	JUTAMONGKON et al.; 2010
Caule	30	-	-	GAUTAN et al.; 2010
Caule	29	8	60	KETNAWA et al.; 2011 ^a
Caule	-	3 – 9	50 – 60	KETNAWA et al.; 2011b
Fruto	-	2,9 – 7,7	37 – 59	CORZO et al.; 2011
Caule	29	-	-	KUMAR et al.; 2011
Caule	-	-	50 – 60	LIANG et al.; 2011
Fruto	-	6	70	SILVESTRE et al.; 2012
Fruto	33	-	-	ARUMUGAM et al.; 2013

Fonte: Adaptada e modificada de Bala et al. (2012).

2. CONCLUSÃO

A bromelina tem tido ampla aplicação na indústria de alimentos, mas ela pode ser utilizada também em indicações clínicas, tais como: agentes antitumorais, modulação imune, limpeza de feridas, aumento do efeito de antibióticos, ação anti-inflamatória, ação mucolítica, auxílio na digestão, aplicações em doenças cardiovasculares e circulatórias, em procedimentos cirúrgicos e ferimentos da musculatura esquelética.

As ROS são formadas como subproduto do metabolismo aeróbico e participam e participam de uma sofisticada rede de vias de sinalização em plantas, em resposta a situações de estresse. Essas espécies químicas tem influência na expressão de vários genes envolvidos no metabolismo e em vias de transdução de sinais, agindo, portanto, como “moléculas sinalizadoras” ou “mensageiros secundários”. Por outro lado, as ROS, quando acumuladas, podem reagir com moléculas biológicas e causar danos irreversíveis que podem levar a morte celular.

Inúmeros trabalhos tem associado o nível de ROS e a atividade de enzimas antioxidantes a processos de sinalização e defesa contra o estresse, incluindo respostas ao déficit hídrico, salinidade, temperaturas externas, metais pesados, ataque de patógenos, além da indução de vias morfogênicas *in vitro*. Contudo, apesar do crescente interesse nessa área de pesquisa, ainda existem diversos aspectos a serem explorados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILIO, G.M.F., HOLSCHUH, H.J., BORA, P.S., 2009. Extraction, bromelain activity and analysis of some chemical parameters in pineapple varieties from Paraíba Rev. Bras. Fruti. 31, 1117-1121.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v.30, p.623-628, 2007.
- AHMAD, P. et al. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, v.51, n.3, p.167-173, 2008.
- AMMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. "Handbook, Protein Purification". 1999.
- ANTUNES, A.M., ONO, E.O., SAMPAIO, A.C., 2008. RODRIGUES, J.D. Physico-chemical and harvest time alterations in pineapple fruits Smooth Cayenne cause by paclobutrazol. Braz. Arch. Biol. Technol. 51, 19-26
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.
- AQUIJE, G. M. F. V., ZORZAL, P. B., BUSS, D. S., VENTURA, J. A., FERNANDES, P. M. B., FERNANDES, A. A. R, 2010. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. Plant. Cell. Rep. 29, 1109-1117.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p.391-396, 2006.
- BALA, M., ISMAIL, N. A., MEL, M., JAMI, M.S., SALLEH, H. M., AMID, A., 2012. Bromelain Production: Current trends and perspective. Arch. Sci. 65, 369-399.
- BALDINI,V.L., IDEROSA, M., FERREIRA, E.A., SALES, A .M., DRAETTA, I.S., GIACOMELLI, E.J., 1993. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro Colet.Inst.Tecnol.Aliment. 53,44-55.
- BARDIYA, N., SOMAYAJI, D., KHANNA, S, 1996. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. *Bioresour. Technol.* 8, 73–76.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BARTHOLOMEW, D.P., PAULL, R.E., Rohrbach, K.G., 2003. The Pineapple Botany, Production and Uses, vol. 1. CABI publishing, London, pp. 1–29, 281–288.
- BARTOLOME, A.P., RUPBREZ, P., CARMEN, F., 1995. Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of *Red Spanish* and *Smooth Cayenne* cultivars. Food Chem. 53, 75–79.

- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologia e Plantarum**, v.19, p.47-64, 1997.
- BENGOZI, F.J., SAMPAIO, A.C., SPOTO, M.H.F., MISCHAN, M.M., PALLAMIN, M.L., 2007. Physicochemical quality of pineapples commercialized in the CEAGESP, São Paul]. *Rev. Bras. Frut.* 29, 540-545.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, p.850-859, 2011.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. En fi eld: Science Publishers, 2010. p.1-30.
- BITANGE, N.T., ZHANG, W., SHI, Y.X., WENBIN, Z., 2008. Therapeutic application of pineapple protease (bromelain). *Pakistan J. Nutr.* 7, 513–520.
- BLOKHINA, O. et al. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.
- BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., 2008. Enzimas em biotecnologia. Produção Aplicações e Mercado, first ed. Interciência, Rio de Janeiro.
- BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase and Stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-11, 1992.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- BRADFORD, M.M.A, 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Bindind. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRATTACHARYA, R., BRATTACHARYA, D., 2009. Resistance of bromelain to SDS binding. *Biochim. Biophys. Acta.* 4, 698 – 708.
- BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.
- CABRAL, H. “Isolamento e caracterização bioquímica de uma cisteíno peptidase de Frutos de Bromelia fastuosa (Gravatá)”. São José do Rio Preto, Brazil, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, Master dissertation, 2001.
- CAO, L., 2005. Protein separation with ion Exchange membrane chromatography. Worcester, United States, Worcester Polytechnic Institute, Master dissertation.
- CARVALHO, V.D., 1999. Composição, colheita, embalagem e transporte do fruto In: Cunha, G. A. P. da; Cabral, J. R. S.; Souza, L. F. da S. (Eds.). *O Abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. Embrapa pp. 367-388

CÉSAR, A. C. W., 2005. Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi. Campinas, Brazil; Universidade Estadual de Campinas, PhD tese.

CHAU, T., DAVID, A.M., 1995. Pineapple waste—a novel substrate for citric acid production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 17, 1107–1110.

COSTA, H. B., DELBONI, S. G., FORTUNATO, F. S., VENTURA, J. A., 2009. Proteolytic activity in stems of 'Vitória', 'Smooth Cayenne' and 'Pérola' pineapple plants. *Acta. Hort.* 822, 239-244.

COSTA, H.B., FERNANDES, P.M.B, VENTURA, J.A, 2012. Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada. Brazilian patente PI10201027122, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food quantity. FAOSTAT, 2012. Available at: < www.faostat.fao.org >

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.385-393, 2003.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.813-824, 2007.

De GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p.195-205, 2004.

DEL RIO, L.A. et al. Peroxisomes as a cellular source of ROS signal molecules. In: DEL RÍO, A.L.; PUPPO, A. **Reactive oxygen species in plant signaling**. Heidelberg: Springer, 2009. p.95-111.

DEL RIO, L.A. et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisome. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1255-1272, 2002.

DELAPLACE, P. et al. Antioxidants involvement in the ageing of non-green organs: the potato tuber as a model. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. New Hampshire, Science Publishers, 2011. Chap.8, p.151-176.

DEVAKATE, R. V., PATIL, V. V., WAJE, S. S., THORAT, B.N., 2009. Purification and drying of bromelain. *Sep. Purif. Technol.* 64, 259-264.

DINAKAR, C. et al. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v.182, p.29-41, 2012.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. En fi eld: Science Publishers, 2011. Chap.9, p.178-203.

E. SILVEIRA, M.E. SOUZA JUNIOR, J.C.C. SANTANA, A. C. CHAVES, A. L. F. PORTO, E. B. Tambourgi,” Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract”. *Braz J Chem Eng.* 26: 149-157, 2009.

FAO, 2008. Statistical Yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, USA, Available at: www.fao.org (accessed 01.07.09).

FAURE, A.M. et al. Ascorbic acid induced degradation of betaglucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.2160-2168, 2012.

FOYER, C.H. et al. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v.60, p.455-84, 2009.

FOYER, C.H. et al. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1637-1661, 2012.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.355-364, 2003.

FOYER, C.H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v.155, p.93-100, 2011.

FRANÇA-SANTOS, A., ALVES, R. S., LEITE, N. S., FERNANDES, R. P. M., 2009. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). *Rev. Scientia Plena*. 5, 1 -6.

FREIMAN, L.O., SABAA SRUR, A.U.O, 1999. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). (L.) Merril. *Food. Scienc. Tech.*19, 170-173.

GADJEV, I. et al. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v.270, p.87-144, 2008.

GARCIA CARRENO, F.C., DIMES, C.E., HAARD, N.F., 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65–69.

GAUTAM, S.S., MISHRA, S.K., DASH, V. GOYAL, A.M. G. Rath, “Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant”. *Thai J. Pharm. Sci*, 34: 67-76, 2010.

GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

HALE, L.P., GREER, P.K., TRINH, C.T., JAMES, C.L., 2005 Proteinase Activity and Stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.* 5, 783-793.

HALE, L.P., GREER, P.K., TRINH, C.T., JAMES, C.L., 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunol.* 5, 783–793.

HARIKRISHNA, S., SRINIVAS, N.D., RAGHAVARAO, K.S.M.S., KARANTH, N.G., 2002. Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 75, 119–183.

HATANO, K., TANOKURA, M.; TAKAHASHI, K., 1998. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. *J. Biochem.* 2, 457–461.

HEBBAR, H. U., SUMANA, B., RAGHAVARAO, K.S.M.S., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 4896–4902.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Mitochondria are the power station of the cell. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic, 2005a. p.135–164.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic, 2005c. p.435–454.

HELDT, H.W.; HELDT, F. The use of energy from sunlight by photosynthesis is the basis of life. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic, 2005b. p.45–66.

HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, C., MARQUEZ, M., BÁEZ, R., MORRIS, H., SANTOS, R., CHÁVEZ, M. A, 2005. Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de Pina (*Ananas comosus*) con potencialidades de uso en la biotecnología y la medicina *Revista CENIC Ciências Biológicas*. 36, 1 -12.

IMANDI, S.B., BANDARU, V.V., SOMALANKA, S.R., BANDARU, S.R., GARAPATI, H.R., 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresour. Technol.* 99, 4445–4450.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Tirth edition. IMESP, São Paulo.

KETNAWA, S., CHAIWUT, P., RAWDKUEN, S., 2012. Pineapple Wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food. Bioprod. Process.* 90, 385–391.

KETNAWA, S., RAWDKUEN, S., 2011. Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. *Food Nutri. Sci.* 2, 393–401.

KETNAWA, S., RAWDKUEN, S., CHAIWUT, P., 2010. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. *Biochem. Eng. J.* 52, 205–211.

- KHATOON, H. YOUNUS, H.; SALEEMUDDIN, M., 2007. Stem Bromelain: An enzyme that naturally facilitates oriented immobilization. *Protein Pept. Lett.* 14, 233-236.
- KO, Y.H., KANG, Y.J., 1990. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island. *Nonmunjip-Cheju Taehakkyo.* 31, 137-142.
- KOH, J., Kang, S.M., Kim, S.J., Cha, M.K., Kwon, Y.J., 2006. Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers. *Fiber Polym.* 7, 180–185.
- KONNO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. 2004. Papain protects treens from herbivorous insects: role of cysteine proteases in látex. *Plant. J.* 37, 370-378.
- KUMAR, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A., 2003. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochem.* 38, 1725–1729.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227, 680-685.
- LEARY, D., VIERROS, M., HAMON, G., ARICO, S., MONAGLE, C., 2009. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Mar. Policy.* 33, 183-194.
- LEE, K.L., ALBEE, K. L., BERNASCONI, R. J., EDMUNDS, T., 1997. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochem. J.* 327,199-202.
- LOPES, F. L. G., JUNIOR, J. B. S., SANTANA, J. C.C. R.R. SOUZA, E. B. Tambourgi, “Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.)”. *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 7: 33-38, 2005.
- MAHMOOD, R., SALEEMUDDIN, M., 2007. Aditonal stabilization of stem bromelain coupled to a thermosensitive polymer by uniform orientation and using polyclonal antibodies. *Biochemistry.* 72, 307-312.
- MAISONNEUVE et LAROSE et A. C. C. T, Paris. Malezieux, E., Bartholomew, D.P., 2003. Plant Nutrition. In: Bartholomew, D.P.; Paul, R.E., Rohbach, K.G (Eds.). *The pineapple: botany, production and uses.* CABI Publishing, pp.143-165. Motulsky, H., 2003. *GraphPad Prism: user’s guide.* v.4.00. San Diego-CA.
- MAURER, H. R., 2001. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life. Sci.* 58, 1234 – 1245.
- MAURER, H.R., 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.* 9, 1234–1245.

MINAMI, Y., DOI, E., HATA, T., 1971. Fractination, purification, and some properties of proteolytic enzymes from stem bromelain. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1419-1430.

MOAC, Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2008. Statistical Yearbook, Thailand, Available at: www.moac.go.th (accessed 01.07.09).

MUNTARI, B. AMID, A.; MEL, M.; JAMI, M.S.; SALLEH, H.M., 2012. Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. *AMB Express*. 15, 2-9.

MURACHI, T., 1976. Bromelain enzymes. In: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 19. Academic Press, New York, pp. 475–485.

MURACHI, T., Bromelain enzymes, 1976, in: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, pp. 475–485.

MURACHI, T., NEURATH, H., 1976. Fractionation and specificity studies on Stem Bromelain. *J. Biol. Chem.* 235, 99-107.

NAPPER, A. D., BENNETT, S.P., BOROWSKI, M., HOLDRIDGE, M. B., LEONARD, M. J., ROGERS, E. E., DUAN, Y., LAURSEN, R. A.; REINHOLD, B., SHAME, S. L., 1994. Purification and 120 characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* 301, 727-735.

NETO, J. A. “Purificação de Enzimas” in: U.A. LIMA, E. AQUARONE, W. BORZANI, W. SCHMIDELL, “*Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.*” Blucher, São Paulo, 377-390, 2005.

NEUTEBOOM, L. W., MATSUMOTO, K. O., CHRISTOPHER, D. A., 2009. An Extend AE-Rich N-Terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is posttranslationally removed during ripening. *Plant Physiol.* 151, 515-527.

NIGAM, J.N., 1998. Single cell protein from pineapple canner effluent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 693–696.

NIGAM, J.N., 1999. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *J. Biotechnol.* 72, 197–202.

OMOJASOLA, P., Folakemi, J., Omowumi, P., Ibiyemi, S.A., 2008. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. *Nat. Sci.* 6, 64–81.

PESSOA JUNIOR, A., KILIKAN, B. V. “Purificação de produtos biotecnológicos”. São Paulo: Manole, 2005. [18]R. V. Devakate, V.V Patil, S.S. Waje, B. N. Thorat, “Purification and drying of bromelain”. *Sep. Purif. Technol.* 64: 259-264, 2009.

PY, C., LACOEUILHE, J.J., TEISSON, C., 1984. L'ananas as culture, ses produits. Salunkhe, D. K., Desai, B.B, 1984. Postharvest biotechnology of fruits. CRC, Boca Raton.

RABELO, A.P.B., TAMBOURGI, E.B., PESSOA JUNIOR, A., 2004. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers, J Chromatogr B. 807, 61 -68.

RASHEEDI, S., HAQ, S. K., KHAN, R. H., 2003. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. Biochemistry (Mosc). 68, 1097- 1100.

ROLLE, R.S., 1998. Enzyme applications for agro-processing in developing countries: an inventory of current and potential applications. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 611–619.

ROWAN, A. D., BUTTLE, D. J., BARRETT, A. J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem. J. 266, 869-875.

SCHIEBER, A., STINTZING, F.C., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments. Trend Food Sci. Technol. 12, 401–413.

SHA, S.F., LI, J.C., WU, J., ZHANG, S.L., 2011. Change the organic acid content and related metabolic enzyme activities in developing 'Xiping pear fruit. Afr. J. Agric. Reseach. 25, 3560-3567.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM O., MANN, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. Germany, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVERSTEIN, R. M. KEZDY, F. J.”Characterization of the pineapple stem proteases (Bromelains)”. Arch. Biochem. Biophys. 167: 678-686, 1975.

SUBHABRATA, S., MAYURA, D., 2006. Industrial and clinical applications excluding diagnostic clinical. Enzymology 1, 1–25.

SUH, H. J., LEE, H., CHO, H.Y., YANG, H.B., 1992. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. Hanguk Nonghwa Hakhoe. 35, 300-307.

SWITZER, R.L., GARRITY, L.F., 1999. Experimental Biochemistry, vol. 2. W.H. Freeman, New York.

TANAKA, K., HILARY, Z.D., ISHIZAKI, A., 1999. Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. J. Biosci. Bioeng. 87, 642–646.

THANONG, R., 1985. Utilization pineapple waste for frozen pineapple concentrate. J. Kasetsart Univ. 19, 101–109.

UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and their Applications, vol. 2. John Wiley & Sons, New York, pp. 146–147.

UMESH, H., SUMANA, B., RAGHAVARAO, K.S.M.S., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 4896–4902.

VALLES, D., FURTADO, S., CANTERA, A.M.B., 2007. Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme Microb. Technol.* 40, 409–413.

VENTURA, J. A., CABRAL, J. R. S., MATOS, A. P. , COSTA, H., 2009. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. *Acta Hort.* 822, 51 -54.

VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L., 2002. Controle das doenças do abacaxizeiro, in: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., MONTEIRO, A.J.A., COSTA, H. (Eds.), Controle de doenças de plantas fruteiras. Federal University of Viçosa, Viçosa, pp. 445 - 510.

WAGNER, F. W., 1986. Assessment of methodology for the purification, characterization, and measurement of proteases, in: Dalling, M. J. Plant (Ed.) *Proteolytic Enzymes*, Florida.

WALSH, G., 2002. Protein Biochemistry and Biotechnology, vol. 1. John Wiley and Sons, New York, pp. 51–210, 419–435

WEERAHEWA, D., ADIKARAN, N.K.B., 2005. Some biochemical factors underlying the differential susceptibility of two pineapple cultivars to internal browning disorder. *Ceylon J. Sci. (Biological Sciences)* 34, 7-20

CAPÍTULO II

**Qualidade, compostos fenólicos, atividade antioxidante e enzimática de
infrutescências de abacaxizeiro da Zona da Mata do estado da Paraíba**

Será submetido: Environmental Pollution – Journal – Elsevier

BARROS, T. F. S. **Qualidade, compostos fenólicos, atividade antioxidante e enzimática de infrutescências de abacaxizeiro da Zona da Mata do estado da Paraíba.** Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Trabalho de Tese em Agronomia. Orientadora: Profª. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

RESUMO

O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de infrutescências do abacaxizeiro. A produção no ano de 2015 foi de aproximadamente 1,7 milhão de infrutescências. Neste cenário, a região Nordeste é a principal produtora, com uma contribuição de aproximadamente 40% da produção total. Por sua vez, o estado da Paraíba, contribui com aproximadamente 18% da produção nacional. Diante disto, objetivou-se nesse trabalho realizar uma caracterização bioquímica de resíduos gerados a partir de extratos de polpa, talo, casca e coroa de três tipos distintos de abacaxizeiro. Os abacaxis foram adquiridos na maturidade comercial, caracterizada pelas malhas da base levemente alaranjadas na base da fruta, em quatro repetições de 20 frutos/variedade (Pérola, Vitória e Imperial). Os frutos foram provenientes de diferentes municípios produtores de abacaxi localizados Mata Paraibana e transportados ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Foram realizadas avaliações nas características físicas e físico-químicas, quantificação dos compostos fenólicos e do teor de proteínas solúveis total, avaliação da atividade antioxidante e do complexo enzimático (SOD, CAT, POD e APX) dos mesmos. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as características físicas, os atributos de massa fresca, comprimento e firmeza diferiram entre as três variedades, e os relacionados ao diâmetro e rendimento não diferiram da 'Vitória' e da 'Imperial', estas se destacaram em relação à 'Pérola' quanto ao teor de sólidos solúveis, contudo não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Os maiores valores de acidez titulável (AT) tanto para polpa quanto para o talo foram encontrados em 'Vitória', contudo estes dados não diferiram de 'Pérola', que por sua vez, apresentou AT estatisticamente igual à 'Imperial'. O pH diferiu entre as variedades, sendo que a 'Imperial' apresentou um pH superior. Os maiores teores de ácido ascórbico foram registrados nos extratos de 'Pérola'. Para os conteúdos de polifenóis extraíveis totais (PET), a porção coroa sobressaiu-se em relação às demais porções, independente das variedades analisadas, seguida da casca, polpa e talo. A 'Vitória' apresentou elevada capacidade antioxidante

pelo método de DPPH'. Em relação à atividade enzimática, tanto para SOD, CAT, POD e APX, a variedade que se destacou em maior atividade também foi a Vitória independente da porção analisada, indicando uma possível associação destes valores a processos de sinalização e defesa contra o estresse, incluindo respostas ao déficit hídrico, salinidade, temperaturas extremas, metais pesados, ataque de patógenos, que esta variedade possa ter sido submetida.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, enzimas antioxidantes, resíduos agroindustriais, ROS.

BARROS, T. F. S. **Quality, phenolic compounds, antioxidant and enzymatic activity of pineapple infructescences from Zona da Mata, state of Paraíba.** Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Thesis in Agronomia. Supervisor: Prof^a. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

ABSTRACT

Brazil occupies the second place in the world ranking of production of infructescences of the pineapple. Production in the year 2015 was approximately 1.7 million infructescences. In this scenario, the Northeast is the main producer, with a contribution of approximately 40% of the total production. On the other hand, the state of Paraíba contributes approximately 18% of the national production. Aiming at this work, a biochemical characterization of residues generated from pulp, stem, shell, and crown extracts of three different varieties of pineapple infructescences was performed. Pineapples were purchased at the commercial maturity, characterized by slightly orange meshes at the base of the fruit, in four replicates of 20 fruits / variety (Pérola, Vitória and Imperial). The fruits came from different pineapple producing municipalities located in Mata Paraibana, Paraíba State, Brazil, and transported to the Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-Colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Evaluations were carried out in the physical and physicochemical characteristics, quantification of the phenolic compounds and the content of total soluble proteins, assessment of antioxidant activity and enzyme complex (SOD, CAT, POD and APX) thereof. The data were submitted to ANOVA and means compared by the Tukey test at 5% probability. For the physical characteristics, the fresh weight of attributes, length and firmness differed between the three varieties, and related to the diameter and yield did not differ from 'Vitória' and 'Imperial', these stood out in relation to the 'Pérola' as the soluble solids, but no statistical differences. The higher titratable acidity values (TA) for both pulp and the stem were found in 'Vitória', but these data do not differ to a 'Pérola', which in turn statistically equal to AT 'Imperial'. The pH varied between varieties, and the 'Imperial' showed a higher pH. The higher ascorbic acid content was recorded in the 'Pérola' extracts. For the total extractable polyphenol content, the crown portion stood out compared to other portions, regardless of the analyzed varieties, then the shell, pulp and stem. The 'Vitória' showed high antioxidant capacity by DPPH' method. Regarding enzymatic activity, both SOD, CAT, POD and APX, the variety that stood out in greater activity was also independent of the analyzed

portion 'Vitória', analyzed portion indicating a possible association of these values signaling processes and defense against stress, including responses to drought, salinity, extreme temperatures, heavy metals, pathogens attack, this variety may have undergone.

Keywords: *Ananas comosus*, antioxidant enzymes, organic residues, ROS

1. INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* var *Comosus*.) é uma espécie frutífera de grande importância econômica e social cultivada em mais de 70 países de clima tropical e subtropical. A participação brasileira de produtos de abacaxi no mercado externo ainda é bastante reduzida, concentrando-se, basicamente, os seus envios para a Itália, Alemanha e Países Baixos (AGRIANUAL, 2014). Além do *A. comosus* todas as outras espécies de *Ananas* são encontradas no Brasil, sendo este país um dos principais centros de diversidade genética (FERREIRA et al., 1998). As características qualitativas do fruto abacaxizeiro e das suas porções refletem na sua importância socioeconômica (LOPES et al., 2013).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, no Brasil a produção está concentrada principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Norte (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014) e o cultivo do abacaxizeiro nestas regiões produtoras brasileiras é realizado em escala comercial, quase que exclusivamente com a cultivar ‘Pérola’ (SPIRONELLO, 2010). A produção brasileira de abacaxis na safra de 2015 atingiu 1.767.267 mil frutos, em uma área plantada de 103.233 hectares, apresentando um rendimento médio de 29.986 frutos por hectare (IBGE, 2016). Entretanto, do abacaxizeiro apenas o fruto e a coroa são comercializados, sendo as cascas, talos, e folhas considerados resíduos pelas unidades produtivas, indústrias de sucos e conservas. Entretanto, porções constituem fontes importantes de nutrientes e compostos antioxidantes que vem despertando expressivo interesse científico.

O Brasil é o terceiro produtor mundial de frutos, com uma produção anual de mais de 43 milhões de toneladas, o que representa 5% da produção mundial. Cerca de 53% da produção brasileira é destinada ao mercado de frutos processados e 47% ao mercado de frutos frescos (IBRAF, 2014). Os altos índices de produtividade e os resultados comerciais são fatores que demonstram o crescimento desse setor. Em resposta a esse avanço, o número de agroindústrias instaladas por todo o Brasil tem aumentado significativamente, gerando um incremento na produção de resíduos agroindustriais, os quais não são utilizados na alimentação humana (LOUSADA JUNIOR et al., 2005). Assim, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico e ambiental. Dessa forma, é necessária investigação científica e tecnológica que possibilite sua utilização eficiente, econômica e segura (SCHIEBER et al., 2001).

O tipo de resíduo gerado no processamento de polpas de frutos depende do seu tipo como processada, sendo, geralmente, constituído de casca, coroa, caroço ou sementes e bagaço. Estes resíduos, apesar de possuírem em sua composição vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes, são desperdiçados na maioria das indústrias (LIMA, 2001). Porém, poderiam ser utilizados em novas formulações alimentares, como em biscoitos, bolos e barras de cereais, minimizando o desperdício de alimentos, agregando valor e gerando uma nova fonte alimentar (OLIVEIRA, 2008). Estudos têm demonstrado que os frutos são ricos em muitos nutrientes e compostos antioxidantes, sendo que esses constituintes se concentram majoritariamente nas cascas e sementes (MELO et al., 2008; COSTA et al., 2000). Vários autores têm associado os efeitos benéficos do consumo regular de frutos, hortaliças e grãos à saúde humana com a presença de substâncias antioxidantes, como os compostos fenólicos, a vitamina C e os carotenoides (KIM et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2006).

Os compostos fenólicos são substâncias que pertencem a um grupo de metabólitos secundários distribuídos pelo o reino vegetal (HAGEN et al., 2009). Este grupo inclui os compostos bioativos que possuem uma elevada capacidade antioxidante (LI et al., 2011), que são benéficos para a saúde, e que estão presentes em frutas, legumes, plantas medicinais, grãos e sementes. Encontram-se divididos em vários subgrupos, que são os ácidos, antocianinas, flavonas, flavonoides e dihidroflavonóis (Treutter, 2005). Os compostos fenólicos presentes nos vegetais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante (HELENO et al., 2015). A proteção atribuída aos antioxidantes é decorrente da sua ação redutora frente a espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (SILVA et al., 2010).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são comumente formadas sob condições de estresse biótico e abiótico (TANG et al., 2016), as ROSs causam danos em lipídios de membrana (afetando sua permeabilidade), proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos (RAJENDRAN, et al., 2014). Nas plantas, existe um complexo sistema de defesa antioxidante que protege os tecidos dos altos níveis das ROS, o qual inclui três classes: o sistema lipossolúvel, que inclui antioxidantes associados à membrana, tais como o α -tocoferol e o β -caroteno; o sistema hidrossolúvel, que inclui a glutatona e o ascorbato; e o sistema enzimático antioxidativo, o qual inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX). Existem também outros antioxidantes que ocorrem naturalmente nas plantas, tais como isoflavina, fenois, poliaminas e aminoácidos específicos, como cisteína e metionina (QUÍÑONES et al.,

2013; RAJENDRAN et al., 2014; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, et al., 2015; TANG et al., 2016).

Com o advento do programa de melhoramento genético do abacaxi, novas cultivares tem sido lançadas para a abacaxicultura do país. A exemplo desse avanço estão as cultivares Vitória (VENTURA et al., 2009) e a cultivar Imperial (CABRAL; MATOS, 2009), ambas resistentes à fusariose causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Dnnell (sin: *F. subglutinans* f. sp. Ananás Ventura, Zambolim & Gilb.). Com isso, o conhecimento das propriedades bioquímicas nessas novas cultivares e consequentemente o estudo da contribuição das diferentes porções do fruto, como potenciais fontes de obtenção dessa enzima, agrega valor ao agronegócio do abacaxizeiro (COSTA et al., 2010).

Considerando-se as elevadas taxas de produção de resíduos agroindustriais geradas a partir das frutas e a importância dos antioxidantes para saúde da população, este estudo objetivou quantificar os compostos fenólicos totais e avaliar a atividade antioxidante e enzimática de diferentes porções de infrutescências de três cultivares distintas de abacaxizeiro ('Pérola', 'Vitória' e 'Imperial') em extratos de polpa, talo, casca e coroa, com a perspectiva de uma melhor utilização dos mesmos do ponto de vista tecnológico e nutricional, agregando valor às porções comestíveis e aos resíduos de seus produtos.

2. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização da qualidade e perfil bioquímico de porções de infrutescências de cultivares de abacaxizeiro a partir de extratos de polpa, talo, casca e coroa.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar características físicas e físico-químicas das infrutescências de abacaxizeiros das cultivares ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante em extratos de polpa, talo, casca e coroa destes cultivares de abacaxi;
- ✓ Determinar a quantidade de proteína total em extratos de polpa, talo, casca e coroa das infrutescências das cultivares estudadas;
- ✓ Avaliar a atividade das enzimas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), ácido ascorbato peroxidase (APX), em extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Interrelacionar as diferenças entre os extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’ de modo a identificar as características que influenciam na variabilidade destas cultivares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência dos Frutos:

O experimento utilizou abacaxis das cultivares Pérola, Vitória e Imperial adquiridos de produtores de diferentes áreas da Zona da Mata Paraibana. Foram adquiridos no dia de colheita 60 frutos de cada cultivar que foram agrupados em três grupos de 20 frutos de cada cultivar de abacaxizeiro (Pérola, Vitória e Imperial), correspondendo dessa forma cada um fruto uma repetição de cada cultivar.

Os abacaxis da cv. 'Pérola' foram provenientes do distrito de Odilândia, localizado no município de Santa Rita, da cv. 'Vitória' do município de Araçagi, e os da cv. 'Imperial' do município de Alhandra, todos localizados na Zona da Mata do estado da Paraíba. Os critérios de adubação e a análise dos solos adotados pelos produtores foram definidos com base nas recomendações dos boletins técnicos para abacaxizeiro dos estados da Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia e Ceará.

Na aquisição, os abacaxis foram selecionados no estágio de maturação adequado para o consumo (maturidade comercial), caracterizado pela cor verde com manchas amarelas na base do fruto. Foram transportados ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, onde foram higienizados em água corrente com utilização de escovas para remoção de sujidades aderidas as malhas das infrutescências, em seguida foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 200 mg.L^{-1} , durante 5 minutos e em seguida imersos em água destilada, durante 2 minutos. Após secagem, os frutos foram separados em partes (polpa, talo, casca e coroa). As amostras foram cortadas em cubos de aproximadamente 1 cm^3 , sendo armazenadas em pacotes com aproximadamente 100g cada e acondicionadas em temperatura de -80°C . Para os ensaios, as amostras foram descongeladas e utilizadas no mesmo dia.

3.2 Características Avaliadas

3.2.1 Comprimento e Diâmetro dos frutos (mm):

Determinados com o auxílio do paquímetro digital, obtendo as medidas na direção perpendicular e paralela ao eixo central dos frutos.

3.2.2 Massa Fresca dos frutos (g):

Através de pesagem individual do fruto em balança semi analítica;

3.2.3 Firmeza dos frutos íntegros (N):

Determinada através do penetrômetro Magness Taylor Pressure Tester, região de inserção de 2/8 polegadas de diâmetro, sendo feitas duas leituras na região equatorial do fruto íntegro em lados opostos.

3.2.4 Potencial Hidrogeniônico – pH:

Utilizando potenciômetro digital, conforme metodologia Instituto Adolfo Lutz – IAL (2008);

3.2.5 Sólidos Solúveis (SS%):

Determinado por leitura direta com refratômetro de bancada tipo Abbe digital, ATAGO N1 com temperatura de 20°C, de acordo com metodologia Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (1984);

3.2.6 Acidez Titulável (AT – g. ácido cítrico. 100 g⁻¹ de polpa):

Determinado por titulometria com solução de NaOH 0,1 M e indicador fenolftaleína, até obtenção de coloração róseo claro permanente, utilizando 5 g da amostra em 50 mL de água destilada conforme metodologia Instituto Adolf Lutz (2005), com resultados obtidos pela fórmula:

$$AT = (V \times F \times M \times PM) / (10 \times P \times n)$$

Sendo,

V = Volume gasto de NaOH em mL;

F = Fator de correção da solução de NaOH;

M = Molaridade da solução de NaOH;

PM = Peso molecular do ácido correspondente em g;

P = Massa da amostra em g;

n = Número de hidrogênios ionizáveis do ácido predominante na amostra.

Os resultados foram expressos em g.ácido cítrico / 100 g de polpa.

3.2.7 Relação SS/AT:

Mediante divisão dos valores de SS por AT (CHITARRA e Chitarra, 2005).

3.2.8 Ácido Ascórbico (mg.100g⁻¹):

Determinado por titulometria, utilizando-se solução de DFI (2,6-dicloro-fenol-indofenol 0,002%) até obtenção de coloração róseo claro permanente do extrato, utilizando-se 1 g da amostra em 50 mL de Ácido Oxálico 0,5% conforme Strohecker e Henning (1967), calculado pela fórmula:

$$AA = \frac{V \times F}{100} \times \frac{100}{p}$$

Onde:

AA = Teor de ácido ascórbico (mg.100g⁻¹);

V= Volume de DFI gasto na titulação;

F = Fator do DFI;

P= Massa de polpa.

3.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

3.3.1 Extrato fenólico:

Obtido conforme Larrauri et al. (1997). Utilizou-se 5 g de polpa e talo e 1 g de casca e coroa congelados em ultrafreezer a -80°C, sendo adicionado 4 mL de metanol 50%, deixando em repouso por 1 hora para extração e seguiu-se de centrifugação por 15 minutos a 15.000 rpm. Adicionou-se 4 mL de acetona 70% ao resíduo, deixando-se extrair por 1 hora, sendo centrifugado por 15 minutos a 15.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado junto com o primeiro sobrenadante, completando o volume para 10

mL com água destilada. Todo procedimento foi realizado na ausência de luz. O extrato foi utilizado em até 4 dias, sendo conservado na geladeira.

3.3.2 Determinação dos polifenóis extraíveis totais (mg.100 g⁻¹):

Determinado de acordo com Larrauri et al. (1997), tomando-se uma alíquota de 0,2 mL do extrato fenólico, completando-se o volume para 1 mL com água destilada, sendo esta alíquota definida com base em curva-padrão de ácido gálico (0 a 50 µg. mL⁻¹), considerando a leitura de absorbância com base na faixa de linearidade da curva padrão (Figura 2). A essa diluição foi adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 2 mL de carbonato de sódio 20% e 2 mL de água destilada. Após agitação, incubou-se a solução, contendo o extrato por 30 minutos na ausência de luz. Para o branco, substituiu-se o volume de extrato por água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (GenesesTM 10s UV VIS) no comprimento de onda a 700 nm.

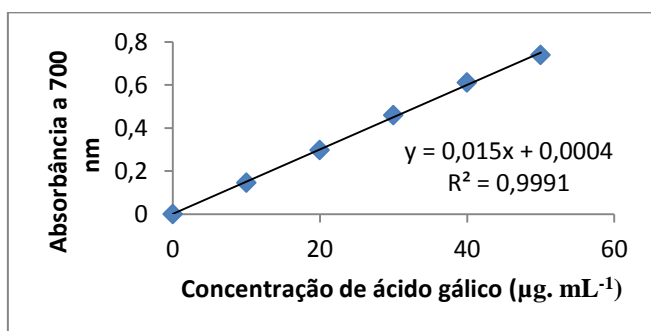


Figura 1: Curva padrão de ácido gálico, utilizada como base para a definição das alíquotas e concentração do extrato fenólico para a determinação de polifenóis extraíveis totais da polpa, talo, casca e coroa de diferentes cultivares de abacaxi.

Para a quantificação dos polifenóis extraíveis totais (PET), expressos em mg de ácido gálico.100g⁻¹ de polpa, procedeu-se com o seguinte cálculo:

$$PET (mg. 100g - 1) = X * \frac{FD1 * FD2}{1000} * 100$$

Onde:

X = Calculado a partir da equação da curva padrão do ácido gálico (µg. mL⁻¹), usando a absorbância da amostra como valor de y;

FD1 (g. mL⁻¹) = Vol. final do extrato (10 mL) / massa de polpa (g);

FD2 = Vol. final da mistura no tubo de reação (extrato + água destilada) – 1 mL/vol. da alíquota de extrato utilizada.

3.3.3 Atividade antioxidante total (AAT) através da captura do radical livre DPPH[•] (g de polpa.g DPPH⁻¹):

Determinada de acordo com Rufino et al. (2010). A partir do extrato fenólico previamente descrito, foram preparadas três diluições (200, 600 e 1000 µL. mL⁻¹) em triplicata, determinadas através de testes prévios, tomando como base a curva padrão do DPPH[•] (concentração final variando de 0 a 60 µM, diluída e metanol P.A.) (Figura 3). De cada diluição, utilizou-se uma alíquota de 100 µL da solução controle (álcool metílico 50% + acetona 70% + água destilada – 4:4:2). Para calibração do espectrofotômetro (GenesesTM 10s UV VIS) no comprimento de onda de 515 nm, utilizou-se álcool metílico P.A..

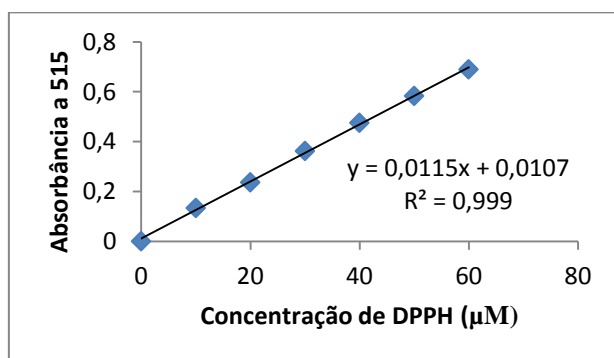


Figura 2: Curva padrão de DPPH[•] utilizada como base para a definição das alíquotas do extrato fenólico de três diluições de extrato de diferentes cultivares de abacaxi.

As diluições foram incubadas à temperatura ambiente, na ausência da luz por 50 minutos, tomando como base a estabilização da absorbância. Para calcular a ATT (g polpa. g DPPH⁻¹), foi determinada a equação da reta, a partir da absorbância das três diluições, substituindo-se em seguida na equação a absorbância equivalente a 50% da concentração do DPPH (absorbância inicial do controle/2), encontrando-se a quantidade da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC₅₀). O valor de EC₅₀ visa fornecer em termos numéricos de quanto de massa fresca do fruto é capaz de fornecer substâncias antioxidantes capazes de sequestrar 1g do radical DPPH ($\text{fruta.g DPPH}^{-1} = (\text{EC}_{50} \text{ (mg L}^{-1}) / 1000 \times 1) / \text{g DPPH}$).

3.4 Atividade enzimática e conteúdo de proteína solúvel

3.4.1 Extração das enzimas SOD, POD, APX e CAT:

A obtenção do extrato bruto para os ensaios enzimáticos foi realizada conforme descrito por Cembrowska-Lech et al., (2015), com modificações. Dois gramas de amostras compostas de porções (polpa, talo, casca e coroa) foram adicionados 10 mL de tampão 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, e 0,1 g de PVP. A solução tampão foi preparada a partir de soluções de estoque de fosfato monobásico de potássio e fosfato dibásico de potássio, conforme descrito por Morita e Assumpção (1986). A mistura foi homogeneizada em almofariz durante três minutos e posteriormente a mistura foi filtrada por papel Whatman nº1 para retenção de fibras e sólidos dispersos e, em seguida centrifugou-se a 9000 rpm durante 25 min a 4 ° C. O sobrenadante foi usado como extrato enzimático. A concentração de proteínas do extrato foi medida a 595 nm, pelo ensaio de Bradford. Foi usada uma curva padrão com albumina bovina (0,23 a 1,6 mg mL⁻¹).

3.4.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1):

Foi testada para quantificar a capacidade de inibir a redução fotoquímica de *Nitro blue tetrazolium* (NBT), de acordo com Lu et al., (2011). A reação (1,5 mL) continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, 2,0 mM de riboflavina, 50 mM de EDTA, 75 mM de NBT, e 50 uL de extrato bruto enzimático. Após a adição de riboflavina, a reação foi desencadeada ao ligar duas luzes 30 W fluorescentes, mantendo-se assim durante 10 minutos, e, em seguida, as luzes foram desligadas. A absorbância da mistura de ensaio foi registada a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade necessária de enzima que inibe a foto-redução de NBT, em 50% sob as condições do ensaio (Lv et al., 2011).

3.4.3 Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6):

Foi realizada conforme recomendações descritas por Yang et al., (2008) com modificações. A reação (1,5 mL) foi composta por 1,29 mL de tampão (100 mM de tampão fosfato de potássio), 60 uL de H₂O₂ a 0,5 M, e 150 uL de extrato enzimático bruto. A diminuição na absorbância a 240 nm resultante do consumo de peróxido de

hidrogénio foi monitorado durante 3 minutos. Uma unidade de atividade de CAT é definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 umol de H_2O_2 por minuto por miligrama de proteína (U mg^{-1} de proteína), considerando-se as condições do ensaio e o coeficiente de extinção de $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Yang et al., 2008).

3.4.4 Atividade da Ácido Ascórbico Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11):

Foi realizada de acordo com Nukuntornprakit et al., (2015) com algumas modificações. A mistura de reação continha 1,3 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), 50 uL de H_2O_2 a 30 mM, 50 uL de ácido ascórbico a 9,0 mM e 100 uL de extrato enzimático. A diminuição na absorbância foi registada durante 3 min a 290 nm, e calculou-se a atividade enzimática de acordo com o coeficiente de extinção de $2,8 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade APX foi definida como a quantidade da enzima que os óxidos de 1,0 umol de ácido ascórbico por miligrama de proteína por minuto (mg L^{-1} de proteína) (Nukuntornprakit et al., 2015).

3.4.5 Atividade da Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)

Foi testada com base na oxidação de guaiacol utilizando H_2O_2 e um coeficiente de extinção de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, seguindo o método descrito por Wu et al., (2010). A mistura da reação continha 1,2 mL de mM de tampão de fosfato de potássio 100 (pH 7,0), 0,1 mL de peróxido de hidrogénio 0,5 M, 0,1 mL de 3% de guaiacol, e 0,1 mL do extrato enzimático. O aumento na absorbância foi monitorado durante 60 segundos a 470 nm. Uma unidade de atividade POD foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a peroxidação de 1,0 umol de guaiacol por miligrama de proteína por minuto (mg L^{-1} de proteína) (Wu et al., 2010).

3.4.6 Conteúdo de Proteína Solúvel

Determinado pelo método de Bradford (1976). Foram utilizadas alíquotas de 50 (casca e coroa) a 200 μL (polpa e talo) do extrato proteico com 2 mL do reagente de Bradford em tubo de ensaio. Quando se utilizou alíquotas menores que 200 μL do extrato, completou-se o volume com água destilada. Estas alíquotas foram definidas com base em curva-padrão de BSA, considerando a leitura de absorbância com base na

faixa de linearidade da curva padrão. Foram preparadas soluções de padrão de BSA com diferentes concentrações (variando de 0 a 100 µg proteína.mL⁻¹ tampão). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por agitação, mantendo em repouso por 5 minutos. Procedeu-se a leituras das amostras em (GenesesTM 10s UV VIS), a 595 nm.

$$Teor\ proteico\ (mg.g - 1) = x * \frac{FD1 * FD2}{1000}$$

Onde:

x = Calculado a partir da equação da curva padrão de BSA (µg. mL⁻¹), usando a absorbância da amostra como valor y;

FD1 (g.mL⁻¹) = Vol. tampão de extração (3 mL) / massa de polpa (g);

FD2 = Vol. final da mistura no tubo de reação (extrato + água destilada) – 0,2 mL / vol. da alíquota utilizada.

3.5 Análise Estatística

Os dados das análises físicas, físico-químicas, compostos bioativos, atividade antioxidante e atividade enzimática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das variedades foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Sisvar[®] versão 5.1 (2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características físicas e físico-químicas

A massa fresca, comprimento e firmeza diferiram entre as infrutescências das cultivares Pérola, Vitória e Imperial, enquanto que o diâmetro e rendimento não diferiram entre as variedades Vitória e Imperial (Tabela 1). O cv. 'Pérola' apresentou a maior massa fresca com médias de 1774,83 g, seguido pelo cv. 'Vitória' com massa de 921,50 g. A menor massa fresca obtida foi a do cv. 'Imperial', com média de 427,98 g, sendo esta cultivar a única a apresentar infrutescências de massa inferior a 500 gramas. Caetano et al., (2015), em experimento conduzido em Cachoeiro de Itapemerim- ES, reportaram massa com valor médio de 926 g para a variedade Imperial. Segundo Cabral e Matos (2009), estes dados de massa são pertinentes, em virtude de a cultivar Imperial apresentar crescimento lento, característica que demanda adequação de época de plantio para obter-se um período mais longo de desenvolvimento da planta no campo até a indução floral, sob pena de produção de frutos menores.

As massas dos frutos da cultivar Pérola deste trabalho são próximas as reportadas por Fagundes et al., (2009) e Sampaio et al., (2011) que, em experimentos conduzidos no município de Sapé - PB encontraram, respectivamente, 1.070 a 1.528 e 1.790 g por Ribeiro (2009) em experimento desenvolvido no município de Arealva - SP. Berilli et al., (2014), avaliando a qualidade de frutos de quatro genótipos de abacaxi para consumo fresco, observaram resultados semelhantes. Caetano et al., (2014), com diferentes cultivares de abacaxi, afirmaram que as cultivares que apresentaram maiores massa de infrutescência e tamanho foram as cultivares Gold e Jupi, diferindo estatisticamente das cultivares Smooth Cayenne, Imperial e Gomo de Mel. Cunha et al., (2007), ao avaliarem genótipos de abacaxi resistentes à fusariose, concluíram que a 'Imperial' e o cruzamento 'PE x SC60' apresentaram os menores valores de massa do fruto, ou seja 0,68 e 0,67 kg, respectivamente. As cultivares Jupi e Gold destacaram-se em relação ao tamanho, com valores de 1,21 e 1,38 kg, respectivamente. Ainda de acordo com o mesmo trabalho, a cultivar Imperial apresentou fruto de 0.67 Kg, bem inferior aos reportados pelos pesquisadores da Embrapa, que descreveram o material com potencial de produzir frutos com coroa de 1,67 kg, usando mudas convencionais (EMBRAPA, 2003).

A perda de massa em abacaxi é, em parte, ocasionada pela perda de turgescência (DANTAS Jr. et al., 2009), que é devida a diferença de pressão de vapor entre o fruto e o ambiente (PALIYATH et al., 2008). O mercado de fruta fresca remunera melhor os frutos grandes, uma vez que o fruto é comercializado por unidade. O abacaxizeiro ‘Pérola’ produz frutos normalmente com massa de 1.000 a 1.500 g (REINHARDT et al., 2002), e a cv. ‘Vitória’ os frutos podem alcançar 1.500 g (VENTURA et al., 2009). Em função da grande desuniformidade na massa dos frutos das cultivares estudadas neste trabalho, pode-se vislumbrar uma variação de tecnologia empregada no manejo cultural do abacaxizeiro e uma falta de padronização dos frutos comercializados. Preferencialmente, o mercado tem exigência por frutos que possuem coroas pequenas, a fim de proporcionar melhor aparência quando oferecidos aos consumidores.

As variedades Pérola e Vitória apresentaram os maiores valores de comprimento, com médias de 23,85 e 11,73 mm, respectivamente, e de diâmetro, com médias de 10,93 e 9,30 mm, respectivamente. Os menores valores de comprimento e diâmetro foram verificados na variedade Imperial com média de 8,70 e 9,32 mm, respectivamente. Contudo, as variedades Vitória e Imperial não diferiram entre si estatisticamente para o atributo diâmetro. Caetano et al., (2015) verificaram maiores valores para comprimento e diâmetro para a cv. Imperial com média de 12,2 e 10,0 mm, respectivamente e para as variedades Pérola e Vitória não constatarem diferenças estatísticas significativas. Segundo Ventura et al., (2009), o diâmetro médio do fruto do abacaxi ‘Vitória’ é de 12,0 mm em frutos de 1.500 g de massa. Amorim et al., (2011), avaliando a qualidade do abacaxi Vitória sob diferentes doses de adubação, obteve valores de 10,9 mm. Caetano et al., (2013), por sua vez, trabalhando com efeito da adubação NPK em abacaxi Vitória, obteve maiores valores de diâmetro, massa do fruto e produtividade, indicando que essa característica pode variar com a forma de adubação e manejo de cultivo.

A variedade Pérola apresentou maior diferença entre o comprimento e diâmetro, consequentemente apresentou também formato mais alongado. Por sua vez, as variedades Vitória e Imperial eram mais arredondadas, pois apresentaram menor relação entre o comprimento e diâmetro. Silva (2009) reportou para abacaxi ‘Vitória’ valores de 14,6 mm para comprimento. Abacaxi ‘Smooth Cayenne’ sob diferentes doses de nitrogênio, apresentou frutos com comprimento de 152 mm sem coroa, conforme reportou Marques (2011). Pleguezuelo et al., (2013), reportam que condições pré-colheita de cultivo como práticas culturais, material vegetal e clima exercem grandes

influência sobre esses atributos físicos. O tamanho e a forma dos frutos são atributos muito importantes, pois quando possuem uma variação dentro do produto, irão afetar a seleção de mercado e a escolha do consumidor (RAMOS et al., 2004).

Infrutescências do Vitória apresentaram a maior resistência de polpa na maturidade comercial, com firmeza média de 70,19 N. O Imperial apresentou menor firmeza com valor de 33,10 N, o Pérola ficou em posição intermediária com média de 43,53 N. Frutos com menores valores de firmeza dificultam as operações de distribuição e comercialização, por serem mais susceptíveis a danos mecânicos, necessitando assim de maior cuidado no transporte para minimizar os danos e manter a aparência final (LIMA et al., 2009, SILVA et al., 2012a). A perda da firmeza está relacionada à diminuição da integridade dos polímeros da parede celular, que durante a maturação são degradados, levando à perda de estrutura e, em consequência, ao amaciamento da textura do fruto pela atividade das enzimas da parede celular, tais como a pectinametilesterase e a poligalacturonase (PALIYATH et al., 2008). Com relação ao rendimento do fruto, a variedade Pérola apresentou maior rendimento com média de 74,41%. E as variedades Vitória e Imperial apresentaram valores de rendimento menores, com média de 60,15 e 65,32% respectivamente, não diferindo estatisticamente entre elas.

Tabela 1: Características físicas de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’ colhidos na maturidade comercial.

CULTIVAR	Massa Fresca (g)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Firmeza (N)	Rendimento (g.100g⁻¹)
Pérola	1774,83a	23,85a	10,93a	43,53b	74,41a
Vitória	921,50b	11,73b	9,30b	70,19a	60,15b
Imperial	427,98c	8,70c	9,32b	33,10c	65,32b

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade. N=20

Considerando a maturidade comercial, o teor de sólidos solúveis (SS - %) diferiu entre os abacaxis ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’ (Tabela 2). A variedade Vitória e Imperial se destacaram em relação à variedade Pérola quanto ao teor de SS, apresentando os valores de 15,02 e 15,17 % respectivamente, contudo não apresentaram diferenças estatísticas entre si. A variedade Pérola apresentou o menor teor de SS com média de 12%. Resultados semelhantes foram apresentados por Caetano et al. (2015), onde os maiores valores de SS também foram encontrados na variedade Imperial. Costa

et al., (2014) ao comparar diferentes fases de maturação da variedade Vitória com a variedade Pérola, constataram maiores valores de sólidos solúveis em Vitória, com níveis variando entre 14,3 a 17,3 %, isto considerando as primeiras fases da maturação. Entretanto Abilío et al., (2009), ao realizar uma análise comparativa entre diferentes cultivares de abacaxi, não encontrou diferenças significativas nos SS entre as variedades Vitória e Pérola. Viana et al., (2013) reportaram para abacaxi 'Vitória' conteúdo de sólidos solúveis em torno de 10,0 %. Thé et al. (2010), avaliando a cultivar Smooth Cayenne, reportaram 8,86 %. Os teores de SS, observados nas porções polpa e talo, apresentaram diferenças entre si nas três variedades estudadas, apresentando a porção polpa um maior teor de sólidos solúveis ao comparar com a porção talo.

As diferenças significativas encontradas no presente trabalho podem estar associadas com as épocas de colheitas, sistemas de cultivo e a influência direta do ponto de colheita e o clima. O teor de açúcar é uma variável de grande importância na determinação da qualidade dos frutos. O conteúdo de açúcar pode ser medido no campo usando um refratômetro manual, que fornece leituras rápidas e práticas que são usadas para controlar a qualidade do fruto (Bengozi et al., 2007). Frutos com teor de sólidos solúveis abaixo de 12 % são considerados imaturos, ou seja, ainda não são adequados para o consumo de acordo com os padrões estabelecidos para o consumo do abacaxi (ANTUNES et al., 2008). De acordo com Ketnawa et al., (2012), o teor de sólidos solúveis normalmente é variável entre as cultivares, e, dentro da mesma cultivar, aceita-se que até 10% do lote dos frutos tenha teores abaixo de 12 %, porém nunca inferiores a 11 %.

Os maiores valores de acidez titulável (AT), tanto para polpa quanto para talo foram encontrados em abacaxis da cultivar Vitória, contudo estes dados não diferiram da variedade Pérola, que por sua vez apresentou AT estatisticamente igual à variedade Imperial. Os teores de AT, observados nas porções polpa e talo, apresentou diferenças entre si nas três variedades estudadas, apresentando a porção polpa um maior teor de acidez ao comparar com a porção talo. Abilío et al. (2009) comparou a acidez titulável de diferentes variedades de abacaxizeiro e não encontraram diferenças significativas. Costa et al., (2015) reportaram que os níveis de AT encontrados em Vitória foram significativamente menores do que na cv. 'Pérola'. A acidez do abacaxi também varia de acordo com a variedade, maturação, fertilização das plantas, local de produção, sendo este último o principal responsável pelo sabor e aceitação comercial da fruta (Thé et al., 2010). Os níveis de acidez aumentam com o início do amadurecimento, ocorrendo

uma posterior diminuição. A diminuição dos níveis de ácidos orgânicos em todos os estágios de amadurecimento do abacaxi é atribuída ao metabolismo da planta. Os ácidos acumulam-se durante o período de crescimento da planta e, durante o amadurecimento da fruta, são consumidos por processos respiratórios (glicólise e o ciclo do ácido cítrico) ou convertidos em açúcares (gliconeogênese) (SHA et al., 2011; THÉ et al., 2010). Na maioria dos frutos, a acidez representa um dos principais componentes do sabor, no entanto a aceitação do fruto depende do balanço entre ácidos e açúcares (CHITARRA; CHITARRA, 2005), sendo que, para o abacaxi, a preferência incide sobre os altos teores de acidez (CARVALHO, 1999).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a relação SS/AT é utilizada para avaliar o grau de maturação e, portanto, o sabor da maioria dos frutos. Neste trabalho, a variedade que apresentou maior relação SS/AT, tanto para polpa quanto para talo foi a Imperial, não diferindo estatisticamente da Vitória, que, por sua vez, também não apresentou diferenças estatísticas da cv. 'Pérola'. Entre as porções analisadas, o talo se sobressaiu em relação à porção polpa na relação SS/AT. Em trabalhos que abordam diferenças entre cultivares de abacaxizeiro, Abílio et al. (2009), reportaram que a variedade Vitória foi a que apresentou maior relação SS/AT. Ventura et al. (2009), observaram que a cv. Vitória apresenta AT superior e a relação SS/AT inferior à cv. Pérola. Já Caetano et al. (2014), afirmam que o maior resultado da relação SS/AT foi para a variedade Imperial. Berilli et al. (2011), avaliando características sensoriais de diferentes cultivares de abacaxi, reportaram relação SS/AT superior a reportada neste trabalho, apresentando valores de 22,17 para o abacaxi 'Pérola'. Os autores mostraram, também, que a cultivar Vitória, com SS/AT de 19,8, apresentou avaliação sensorial similar às cultivares Pérola e Gold já estabelecidas no mercado consumidor. Segundo Malezieux e Bartholomew (2003), o abacaxi de alta qualidade apresenta um alto teor de açúcar (TSS) e uma baixa acidez (AT), assim, as propriedades físico-químicas do abacaxi são parâmetros importantes para controlar a entrega de produtos apreciável pelos consumidores.

O pH diferiu entre as cultivares, onde a variedade Imperial apresentou pH superior, com média de 4,43 para a porção polpa e 4,51 para a porção talo; a variedade Pérola apresentou média de pH de 3,54 para a porção polpa e 3,88 para porção talo; a variedade Vitória apresentou média de pH de 3,53 para a porção polpa e também 3,53 para a porção talo. Esses últimos resultados estão bem próximos aos reportados por Berilli et al. (2014), com pH de 3,6 para a cultivar Vitória e 3,8 para a cultivar Pérola. Em contrapartida, Viana et al., (2013), avaliando características físico-químicas em oito

híbridos de abacaxi, incluindo as cultivares Pérola e Vitória, mostraram que o pH é similar dentre as diferentes cultivares de abacaxi.

Os teores de ácido ascórbico (AA – mg.100g⁻¹) da variedade ‘Pérola’ difeririam das demais variedades de abacaxi avaliadas, conforme apresentado na tabela 2. A variedade ‘Pérola’ apresentou os maiores conteúdos de ácido ascórbico, com média de 35,87 mg.100g⁻¹ para polpa e 18,56 mg.100g⁻¹ para talo, respectivamente, seguidas de 16,40 mg.100g⁻¹ para polpa e 10,40 mg.100g⁻¹ para o talo da variedade Vitória e 16,96 mg.100g⁻¹ para a variável polpa e 12,29 mg.100g⁻¹ para talo da variedade Imperial, que apresentaram os menores conteúdos de ácido ascórbico, não diferindo estatisticamente entre si. Os maiores valores de ácido ascórbico, independente das variedades analisadas, foram encontrados nos extratos do resíduo de polpa.

Viana et al. (2013), reportaram ácido ascórbico em torno de 16 mg.100 g⁻¹ para a variedade Vitória, 21 mg.100 g⁻¹ para ‘Pérola’ e 15 mg.100 g⁻¹ para ‘Smooth Cayenne’. Thé et al., (2010), para ‘Smooth Cayenne’, cultivado também sob adubação convencional, observaram conteúdo em média de 19,19 mg.100 g⁻¹. Portanto, observa-se que o conteúdo de ácido ascórbico da cv. Vitória é bem próximo ao das cvs. ‘Pérola’ e ‘Smooth Cayenne’. Dantas et al., (2014), em experimento com a variedade Vitória sob adubação nitrogenada obteve maior teor de ácido ascórbico médio de 18,36 mg.100 g⁻¹. As divergências nos conteúdos de ácido ascórbico podem ser associadas às diferenças nos estádios de maturação dos frutos, nas condições de cultivo, o clima e o tipo de solo da região (FARAONI et al., 2009). Outros fatores, como diferenças no preparo da amostra e os métodos utilizados para quantificação podem interferir na variação dos resultados citados na literatura (RIBEIRO & SHIELBER, 2010).

Tabela 2: Características físico-químicas das porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial colhidos na maturidade comercial.

VARIÁVEIS	CULTIVAR					
	PÉROLA		VITÓRIA		IMPERIAL	
	POLPA	TALO	POLPA	TALO	POLPA	TALO
Sólidos Solúveis (%)	12,00Ba	8,08Bb	15,02Aa	12,94Ab	15,17Aa	13,08Ab
pH	3,54Bb	3,88Bb	3,53Bb	3,53Bb	4,43Aa	4,51Aa
Ácido Ascórbico	35,87Aa	18,56Ab	16,40Ba	10,40Bb	16,96Ba	12,29Bb
Acidez Titulável	0,64ABa	0,22Bb	0,65Aa	0,28Ab	0,55Ba	0,19Bb
SS/AT	17,35Bb	41,44Ba	23,12ABb	45,80ABa	27,38Ab	73,39Aa

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

4.2 Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

Os teores de polifenóis extraíveis totais (PET – mg.100g^{-1}) do extrato da polpa da variedade de abacaxi ‘Pérola’ diferiu da variedade ‘Imperial’, com média de 32,09 e 27,58 mg.100g^{-1} , respectivamente. A variedade ‘Vitória’ apresentou valores, em média, de 18,81 mg.100g^{-1} , inferiores as demais variedades analisadas, diferindo dessa forma, estatisticamente entre as demais. Os PETs para a porção polpa apresentados neste trabalho foram inferiores aos reportados por Gardner et al., (2000), que encontraram valores médios de 35 mg.100g^{-1} e Alothman et al., (2009), que reportaram variações de 34 a 54 mg.100g^{-1} , utilizando diferentes soluções para obtenção dos extratos. Samee et al., (2006) reportaram, para abacaxi cultivado na Tailândia, PET de 12 mg.100g^{-1} , inferiores aos observados neste trabalho para as três variedades de abacaxi. Dantas et al., (2014), apresentou valores de PET variando entre 16 e 23 mg.100g^{-1} . A divergência dos conteúdos de PET, entre outras características encontradas nesse trabalho, podem ser atribuídas, entre outros fatores, a diferenças genéticas (AQUIJE et al., 2010).

Em relação ao conteúdo de PET no talo, comportamento semelhante foi observando entre as infrutescências das cultivares de abacaxizeiros estudados neste trabalho, a cv. Pérola apresentou teores de PET em média de 18,28 mg.100g^{-1} , não diferindo estaticamente da cv. Imperial com média de 22,18 mg.100g^{-1} , nem tão pouco da cv. Vitória, que apresentou 14,63 mg.100g^{-1} . Os PETs na porção casca foram muito superiores em comparação aos encontrados nas porções polpa e talo. A variedade Pérola apresentou o maior valor de PET da casca, com média de, 75,68 mg.100g^{-1} . A variedade Imperial apresentou o menor valor deste parâmetro, com média de 63,39 mg.100g^{-1} . Ligeiramente inferior a variedade Vitória que apresentou média de 66,52 mg.100g^{-1} , não diferenciando-se estaticamente da anterior, conforme apresentando na tabela 3. Pereira et al., (2009), reportaram teores de fenólicos totais, com média de 81,0 mg.100g^{-1} para as cultivares ‘Jupi’ e ‘MD2’ e de 85,7 mg.100g^{-1} para o abacaxi Pérola.

Em relação à porção coroa, a cultivar com maior destaque no conteúdo de PET foi à variedade Imperial, com média de 65,05 mg.100g^{-1} não diferindo estaticamente da variedade Vitória que apresentou média de 63,75 mg.100g^{-1} . A variedade Pérola foi a que apresentou o menor teor de PET na coroa com média de 48,14 mg.100g^{-1} . As diferenças nos teores de fenólicos podem ser atribuídas a grande variedade de compostos fenólicos individuais presentes nas variedades de abacaxi. Pesquisas sobre os compostos bioativos e sobre a atividade antioxidante de variedades de abacaxi trarão as

informações que ajudarão na seleção de variedades com potencial para se tornarem ingredientes funcionais de alimentos. Resíduos da agroindústria do abacaxi (polpa, talo, casca e coroa), devido à grandeza nutricional e funcional podem ser aditivos na alimentação, melhorando a qualidade dos mesmos.

Tabela 3: Compostos fenólicos das porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial colhidos na maturidade comercial.

Cultivar	PET (mg.100g ⁻¹)			
	Polpa	Talo	Casca	Coroa
Pérola	32,09Ac	18,28ABd	75,68Aa	48,14Cb
Vitória	18,81Bb	14,63Bb	66,52Ba	63,75Aa
Imperial	27,58Ab	22,18Ab	63,39Ba	65,05Aa

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

A atividade antioxidante total medida pela capacidade de captura do radical DPPH, por extratos fenólicos (EC50 – mg.mL⁻¹) da polpa e da casca também diferiram entre as variedades de abacaxi avaliadas, conforme pode ser observado na tabela 4. O ensaio DPPH é utilizado para medir o potencial de redução de extratos antioxidantes com base na sua capacidade como doador de hidrogênio e de transferência de elétrons (ZULKIFLI et al., 2012). Portanto, quanto maior o EC50 menor será a capacidade antioxidante do extrato. Nas polpas, os extratos fenólicos das variedades Pérola e Imperial apresentaram os menores valores de mg.mL⁻¹, ou seja, apresentaram maior capacidade antioxidante, com médias de 3.786,53, 6.332,98 mg.mL⁻¹, respectivamente, sendo a variedade Pérola com maior capacidade antioxidante. Por sua vez, os extratos fenólicos das polpas da ‘Vitória’ apresentaram a menor atividade antioxidante, com média de 12.217,64 mg.mL⁻¹. De acordo com Kuskoski et al., (2005), as polpas de frutos tropicais congelados apresentam elevados valores de atividade antioxidante. Entretanto, a eficiência antioxidante dos compostos bioativos dos vegetais depende de estrutura e da concentração no alimento, sendo que, a quantidade destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta (OLIVEIRA et al., 2009). Silva (2010), estudando abacaxi ‘MD-2’ submetido à adubação com diferentes relações K/N, reportou valores variando de 7.348 a 13.463 mg.mL⁻¹, sendo a maior atividade observada na relação 3:1, podendo ter sido influenciado, principalmente, pelo aumento nas doses de K. Dantas et al., (2014), estudando abacaxi ‘Vitória’ submetido a diferentes dosagens de nitrogênio, reportaram valores variando de 5.512,69 a 8.003,71 mg.mL⁻¹.

No talo, os extratos fenólicos das variedades Imperial e Pérola que apresentaram os menores valores de mg.mL^{-1} , ou seja, apresentaram maior capacidade antioxidante, com médias de 6.530,38, 8.004,44 mg.mL^{-1} , respectivamente, sendo a variedade Imperial com maior capacidade antioxidante. Por sua vez, os extratos fenólicos da porção talo da ‘Vitória’ apresentou a menor atividade antioxidante, com média de 13.259,31 mg.mL^{-1} . Com relação à casca, os extratos fenólicos das variedades Pérola, Vitória e Imperial, apresentaram estaticamente as mesmas capacidades de sequestro do radical DPPH, com média de 6.665,09, 6.695,99, 6.905,74 mg.mL^{-1} respectivamente. Para a porção coroa, os extratos fenólicos que apresentaram os menores valores de mg.mL^{-1} , com média de 4.906,96 mg.mL^{-1} foi a variedade Vitória, não diferente das demais variedades estudadas que apresentaram médias de 6.041,91 para a variedade Imperial e 6.458,16 para a ‘Pérola’. Infrutescências de abacaxizeiro apresentaram atividade muito mais baixa quando comparada com outros frutos, a exemplo de abacate, uva, mamão, manga, kiwi, entre outros (GARCIA-ALONSO et al., 2004).

Tabela 4: Atividade antioxidante total (AAT) das porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial colhidos na maturidade comercial.

Cultivar	AAT (g.polpa.gDPPH)			
	Polpa	Talo	Casca	Coroa
Pérola	3.786,53Cb	8.004,44Ba	6.665,09Aa	6.458,16Aa
Vitória	12.217,64Aa	13.259,31Aa	6.695,99Ab	4.906,69Ac
Imperial	6.332,98Ba	6.530,38Ba	6.905,74Aa	6.041,94Aa

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

4.3 Atividade Enzimática

Entre as variedades de abacaxizeiros estudadas, a que apresentou maior destaque para a atividade enzimática da SOD foi à Vitória com médias de 291,13, 238,42, 343,28 e 324,57 para as porções polpa, talo, casca e coroa, respectivamente. Esses valores indicam que essa variedade passou possivelmente por um maior nível de estresse ambiental quando comparada as demais analisadas nesse trabalho. A variedade Pérola não apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparada a ‘Imperial’, exceto para as porções casca e coroa, onde apresentou médias inferiores, conforme apresentado na tabela 5. As superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) são metaloenzimas consideradas a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) e que catalisam a dismutação de dois radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, gerando H_2O_2 e O_2 . Essas

enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010). Uma vez que dismutam o $O_2^{\bullet-}$, agem indiretamente na redução do risco de formação do OH^{\bullet} a partir do $O_2^{\bullet-}$ (DUBEY, 2011; DINAKAR et al., 2012). O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia muito de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada enzima (BOWLER et al., 1992). Nascimento et al., (2013) ao quantificar a atividade enzimática da SOD em duas cultivares de abacaxizeiros ‘Vitória’ e ‘Pérola’ em diferentes tempos, reportaram uma maior atividade para a ‘Vitória’ em detrimento da ‘Pérola’, demonstrando que ao primeiro sinal de alteração do fluxo normal da célula, induzido no caso pelo estresse por injúria, ocorre uma rápida resposta pelo aparato enzimática da cultivar ‘Vitória’. Como a SOD é a primeira resposta ao estresse oxidativo, há uma elevada produção de H_2O_2 que por sua vez atua diretamente contra o elicitador causador do desequilíbrio, patógeno ou praga, por exemplo, ou como sinalizadores para processos de lignificação e, conseqüentemente, recuperação da parede celular rompida (BRADLEY et al., 1992).

Tabela 5: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial colhidos na maturidade comercial.

Cultivar	SOD (U mg ⁻¹ de proteína)			
	Polpa	Talo	Casca	Coroa
Pérola	119,07Bb	135,86Bb	206,04Ba	140,95Cb
Vitória	291,13Ab	238,42Ab	343,28Aa	324,57Aa
Imperial	126,55Bc	138,73Bbc	158,48Cb	239,56Ba

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

Entre as variedades de abacaxizeiros estudadas, a que apresentou maior destaque para a atividade enzimática da CAT continuou sendo a ‘Vitória’, com médias de 0,09, 0,02, 0,20 e 0,24 para as porções polpa, talo, casca e coroa, respectivamente. A porção talo independente da variedade analisada, não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação às demais. A variedade Pérola não apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparada a variedade Imperial, exceto para a porção coroa, onde apresentou médias inferiores, conforme apresentado na tabela 6. A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração, a β -oxidação dos ácidos graxos e a atuação de defesa da SOD. Ela converte duas moléculas de H_2O_2 a H_2O e oxigênio molecular (HELDT & HELDT,

2005c; DUBEY, 2011). Uma unidade de CAT é definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 umol de H_2O_2 por minuto por miligrama de proteína ($U\ mg^{-1}$ de proteína). As plantas possuem várias isoformas de CAT, as quais podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (BREUSEGEM et al., 2001). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H_2O_2 (mM), por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores (DUBEY, 2011).

Tabela 6: Atividade enzimática da catalase (CAT) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial colhidos na maturidade comercial.

Cultivar	CAT ($U\ mg^{-1}$ de proteína)			
	Polpa	Talo	Casca	Coroa
Pérola	0,02Bc	0,01Ad	0,06Bb	0,09Ca
Vitória	0,09Ac	0,02Ad	0,20Ab	0,24Aa
Imperial	0,03Bc	0,01Ad	0,07Bb	0,17Ba

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

Entre as variedades de abacaxizeiros estudadas neste trabalho, a que apresentou maiores médias para a atividade enzimática da APX continuou sendo à variedade ‘Vitória’ com médias de 3,23, 1,24, 2,49 e 4,62 para as porções polpa, talo, casca e coroa. A porção talo, independente da variedade analisada, não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação às demais. A variedade Pérola não apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparada a variedade Imperial, onde apresentou médias superiores para as porções polpa e coroa e média inferior para a porção casca, conforme apresentado na tabela 7. A enzima ácido ascórbico peroxidase (APX, CE 1.11.1.11) é uma heme-proteína, da Classe I da superfamília das peroxidases, com distintas formas isoenzimáticas, diversamente reguladas. Suas isoformas podem ser encontradas em citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos (estroma e ligadas às membranas dos tilacóides) e parede celular (DABROWSKA et al., 2007; De GARA, 2004). A APX exige o ácido ascórbico como redutor. Tem alta afinidade com o H_2O_2 , com uma constante de Michaelis-Menten (K_m) na ordem de μM , permitindo a eliminação do H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (LOCATO et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

A APX e a CAT são as duas enzimas mais importantes dentre os componentes de desintoxicação do H_2O_2 (BHATT & TRIPATHI, 2011). A ação da CAT e das peroxidases destaca a diferença básica entre as duas principais rotas metabólicas do H_2O_2 nas células. A remoção de H_2O_2 por peroxidases requer uma pequena molécula redutora (ou proteínas como o citocromo c ou tioredoxina) para agir como um co-fator de regeneração e não leva à evolução de O_2 , porque a água é o produto da reação (MHAMDI et al., 2012). Nos cloroplastos e mitocôndrias, a APX atua no ciclo ascorbato-glutationa, no qual o H_2O_2 formado pela ação da SOD é reduzido pelo ascorbato (MITTLER, 2002; LOCATO et al., 2010). Nos cloroplastos, a fotoredução do oxigênio à água pode gerar $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , que são eliminados pela ação da SOD e da APX, respectivamente (ASADA, 2006).

Tabela 7: Atividade enzimática da ácido ascorbato peroxidase (APX) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial colhidos na maturidade comercial.

Cultivar	APX (U mg ⁻¹ de proteína)			
	Polpa	Talo	Casca	Coroa
Pérola	1,26Ba	1,12Aa	1,10Ba	1,28Ba
Vitória	3,23Ab	1,24Ad	2,49Ac	4,62Aa
Imperial	1,16Bab	1,01Ab	1,34Ba	1,14Bab

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

Em relação à peroxidase (POD, E.C 1.11.1.7), que foi avaliada com base na oxidação de guaiacol utilizando H_2O_2 , a variedade Vitória também foi a que apresentou maior atividade enzimática com médias de 3,23, 4,40, 5,37 e 4,91 para as porções polpa, talo, casca e coroa, respectivamente. A porção polpa não apresentou diferenças estatísticas significativas em relação às variedades Pérola e Imperial, apresentando esta última média superior. Entretanto, as porções talo, casca e coroa diferiram estatisticamente uma da outra em relação às variedades estudadas, conforme apresentado na tabela 8. Nas plantas, as PODs existem em muitas isoformas e estão envolvidas em uma série de processos celulares. Algumas PODs são constitutivamente expressas, enquanto outras são induzidas por estresses ambientais, como constatado em estudos em que baixas atividades mostram sintomas de estresse menos graves e as altas, sintomas mais graves. As PODs utilizam o H_2O_2 como oxidante e compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons. Dessa forma, o H_2O_2 formado pela ação da SOD também pode ser eliminado pelas PODs, além da CAT e APX (LOCATO et al.,

2010). As PODs localizam-se principalmente na parede celular e no vacúolo. Sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores bióticos e abióticos, bem como na identificação precoce de processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas (LIMA et al., 2002; PIZA et al., 2003; LOCATO, 2010; KIM & KWAN, 2010).

Tabela 8: Atividade enzimática da peroxidase (POD) nas porções polpa e talo para as variedades de abacaxizeiro Pérola, Vitória e Imperial.

Cultivar	POD (U mg⁻¹ de proteína)			
	Polpa	Talo	Casca	Coroa
Pérola	1,13Bc	1,51Cb	3,74Ba	0,55Cd
Vitória	3,23Ad	4,40Ac	5,37Aa	4,91Ab
Imperial	1,14Bb	2,17Ba	1,16Cb	1,19Bb

*Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

O OH^\bullet é uma molécula altamente nociva em sistemas vivos e às enzimas do sistema antioxidante não o eliminam diretamente, de modo que a regulação de seus precursores, O_2^\bullet e H_2O_2 , é o passo fundamental na prevenção dos riscos do OH^\bullet , reunindo a ação das enzimas SOD, CAT, POD e APX (BHATTACHARJEE, 2010; MYLONA & POLIDOROS, 2010). As ROS de maneira geral são formadas como subproduto do metabolismo aeróbico e participam de uma sofisticada rede de vias de sinalização em plantas, em resposta a situações de estresse. Essas espécies químicas têm influência na expressão de vários genes envolvidos no metabolismo e em vias de transdução de sinais, agindo, portanto, como “moléculas sinalizadoras” ou “mensageiros secundários”. Por outro lado, as ROS, quando acumuladas, podem reagir com moléculas biológicas e causar danos irreversíveis que podem levar à morte celular.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado, considerando as características físicas, as variedades Vitória e Imperial assemelharam-se mais entre si do que quando comparadas individualmente com a 'Pérola'. Entretanto, esta última apresentou melhores valores, destacando-se quando comparada as demais. Para as características físico-químicas, as variedades Vitória e Imperial tanto para a porção polpa quanto para a talo se sobressaíram em relação à 'Pérola' quanto ao teor de sólidos solúveis; os maiores valores de acidez titulável (AT), tanto para polpa quanto para talo foram encontrados em 'Vitória', contudo estes dados não diferiram de 'Pérola', que por sua vez, apresentou AT estatisticamente igual à variedade Imperial. O pH diferiu entre as três variedades, sendo que a 'Imperial' apresentou pH superior quando correlacionada com as demais.

As variedades Pérola e Imperial se sobressaíram quanto aos compostos fenólicos e atividade antioxidante de todas as porções analisadas, apresentando elevados teores de PET e elevada capacidade de sequestro dos radicais DPPH, principalmente nas porções casca e coroa. O abacaxi 'Pérola' também apresentou superiores teores de ácido ascórbico. A casca do abacaxi 'Pérola' destacou-se pelos maiores teores de compostos fenólicos que refletiram em elevada atividade antioxidante em média 4 e 6 vezes superiores as das polpas e talos, respectivamente. O abacaxi 'Vitória' apresentou baixos teores de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante por DPPH e baixos teores de ácido ascórbico na polpa e no talo. As cascas e as coroas dos abacaxis, em especial as da variedade Pérola e Imperial se configuram como importante fonte de compostos benéficos à saúde humana, apresentando assim grande aplicabilidade em indústrias farmacêuticas.

A variedade Vitória se destacou em detrimento a 'Pérola' e a 'Imperial' em relação ao nível de atividade para as enzimas SOD, CAT, POD e APX, indicando uma possível associação destes valores a processos de sinalização e defesa contra o estresse, incluindo respostas ao déficit hídrico, salinidade, temperaturas extremas, metais pesados, ataque de patógenos, que esta variedade possa ter sido submetida. Contudo, estudos mais aprofundados em proteômica e metabolômica poderiam ajudar em uma melhor compreensão das redes bioquímicas envolvidas nas respostas celulares ao estresse oxidativo, permitindo uma visão mais ampla do papel das espécies reativas de oxigênio em todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v.30, p.623-628, 2007. doi: 10.1590/S0100-40422007000300023.
- AHMAD, P. et al. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, v.51, n.3, p.167-173, 2008. doi:10.1007/BF03030694.
- ALOTHMAN, M., BHAT, R., & KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785-788, 2009.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 17. ed. Washington: AOAC, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141, p.391-396, 2006. doi:10.1104/pp.106.082040.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006. doi:10.1590/S0100-40422006000100021.
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.19, p.47-64, 1997. doi: 10.1007/s11738-997-0022-9.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, p.850-859, 2011. doi 10.1016/j.bbr.2011.03.031.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.1-30.
- BI, X.; Zhang, J.; Chen, C.; Zhang, D.; Li, P.; Ma, F. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food chemistry*, v. 152, p. 205-209, 2014.
- BLOKHINA, O. et al. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003. doi:10.1093/aob/mcf118.
- BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase and Stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-11, 1992. doi: 10.1146/annurev.pp.43.060192.000503.

BRASIL (2000) Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa Nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas. Diário Oficial da União, Nº 6, Brasília, 10 de janeiro de 2000. Seção 1, p.54-58.

BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

CAETANO, L. C. S., VENTURA, J. A., Costa, A. F. S., & GUARÇONI, R. C. Efeito da adubação com Nitrogênio, Fósforo e Potássio no desenvolvimento, na produção e na qualidade de frutos do abacaxi 'Vitória'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 883-890, 2013.

CHEN, C. C., & PAULL, R. E. Sugar metabolism and pineapple flesh translucency. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 5, p. 558-562, 2000.

CHEN, C. C.; PAULL, R. E. Fruit temperature and crown removal on the occurrence of pineapple fruit translucency. **Scientia Horticulturae**, v. 88, n. 2, p. 85-95, 2001.

CHEN, G. L.; CHEN, S. G.; ZHAO, Y. Y.; LUO, C. X.; LI, J.; GAO, Y. Q. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 150-157, 2014.

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.385-393, 2003. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01300-X.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.813-824, 2007. doi: 10.1038/nrm2256.

DABROWSKA, G. et al. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.

DANTAS, A. L., DE MELO SILVA, S., DANTAS, R. L., PEREIRA, W. E., LIMA, R. P., MENDONÇA, R. M. N., & SANTOS, D. Influence of combined sources of nitrogen fertilization on quality of cv. Vitória pineapple. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 40, p. 3814-3824, 2015.

De GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p.195-205, 2004. doi: 10.1023/B:PHYT.0000047795.82713.99.

DEL RIO, L.A. et al. Peroxisomes as a cellular source of ROS signal molecules. In: DEL RÍO, A.L.; PUPPO, A. **Reactive oxygen species in plant signaling**. Heidelberg: Springer, 2009. p.95-111.

DEL RIO, L.A. et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisome. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1255-1272, 2002. doi:

10.1104/pp.106.078204.

DELAPLACE, P. et al. Antioxidants involvement in the ageing of non-green organs: the potato tuber as a model. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. New Hampshire, Science Publishers, 2011. Chap.8, p.151-176.

DEVI, M. A., & GIRIDHAR, P. Variations in Physiological Response, Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Activities, Proline and Isoflavones Content in Soybean Varieties Subjected to Drought Stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2015.

DINAKAR, C. et al. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v.182, p.29-41, 2012. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.01.018.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.9, p.178-203.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Roma: FAOSTAT Database Gateway-FAO.

FAO/OMS. Human Vitamin and Mineral Requirements. In: Report 7thJoint FAO/OMS Expert Consultation. Bangcoc, Tailândia, 2001.

FAOSTAT, FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2016.

FAURE, A.M. et al. Ascorbic acid induced degradation of betaglucan: Hydroxyl radicals as intermediates studied by spin trapping and electron spin resonance spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.2160-2168, 2012. doi:10.1016/j.carbpol.2011.10.045.

FOYER, C. H., & NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 2-18, 2011.

FOYER, C.H. et al. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v.60, p.455-84, 2009. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.091948.

FOYER, C.H. et al. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.1637-1661, 2012. doi:10.1093/ers013.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.355-364, 2003. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x.

FOYER, C.H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology**, v.155, p.93-100, 2011. doi:10.1104/pp.110.166181.

GADJEV, I. et al. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v.270, p.87-144, 2008. Acesso em: 12 set. 2012.

GARRIDO-NOVELL, C., PÉREZ-MARIN, D., AMIGO, J. M., FERNÁNDEZ-NOVALES, J., GUERRERO, J. E., & GARRIDO-VARO, A. Grading and color evolution of apples using RGB and hyperspectral imaging vision cameras. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 2, p. 281-288, 2012.

GIL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Mitochondria are the power station of the cell. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego:Academic, 2005a. p.135-164.

HELDT, H.W.; HELDT, F. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic, 2005c. p.435-454.

HELDT, H.W.; HELDT, F. The use of energy from sunlight by photosynthesis is the basis of life. In: HELDT, H.W. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic, 2005b. p.45-66.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R.; FERREIRA, I. C. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, v. 173, p. 501-513, 2015.

HOSSAIN, M. A., & RAHMAN, S. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 672-676, 2011.

HOTEGNI, V. N. F., LOMMEN, W. J., VAN DER VORST, J. G., AGBOSSOU, E. K., & STRUIK, P. C. Bottlenecks and opportunities for quality improvement in fresh pineapple supply chains in Benin. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 17, n. 3, p. 139-170, 2014.

HUANG, MING; XU, QIANG; DENG, XIU-XIN. L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). *Journal of plant physiology*, v. 171, n. 14, p. 1205-1216, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2016.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1821- 1835, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IAL, 1020 p. 2008. 1 ed. digital.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. I. Artificial data. *Appl. Stat.*, 21(2): p. 160-173, 1972.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. II. Real data. *App. Stat.*, 21(1):21-3, 1973.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.6, p.709-725, 2011.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.129-150.

KOVALCHUK, I. Multiple roles of radicals in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.31-44.

ŁATA, B. Variability in enzymatic and non-enzymatic antioxidants in red and green-leafy kale in relation to soil type and N-level. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 38-45, 2014.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n.3, p.293-303, 2001. Disponível em: <<http://www.rbcf.usp.br/edicoes/Volumes/V37N3/PDF/v37n3p293-303.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2012.

LIMA, G.P.P. et al. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz CV ‘MCOL 22’) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.2, p.107-110, 2002. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v8n2/artigo04.pdf>>. Acesso em: 19 maio 2012.

LIMA, R. P., SILVA, S. M., DANTAS, R. L., DANTAS, A. L., SOUSA, A. S. B., PEREIRA, W. E., MENDONÇA, R. M. N. Use of Digital Image Processing for Evaluation of Translucency in Fresh Cut ‘Pérola’ Pineapple Coated with Biofilms. In: **III International Conference on Fresh-cut Produce: Maintaining Quality & Safety**, September 13-18, 2015.

LIN, Y., LIN, Y., LIN, H., ZHANG, S., CHEN, Y., & SHI, J. Inhibitory effects of propyl gallate on browning and its relationship to active oxygen metabolism in pericarp of harvested longan fruit. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1122-1128, 2015.

LIU, R. X., ZHOU, Z. G., GUO, W. Q., CHEN, B. L., & OOSTERHUIS, D. M. Effects of N fertilization on root development and activity of water-stressed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Agricultural water management**, v. 95, n. 11, p. 1261-1270, 2008.

LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2010. p.45-64.

LU, X., SUN, D., LI, Y., SHI, W., & SUN, G. Pre-and post-harvest salicylic acid treatments alleviate internal browning and maintain quality of winter pineapple fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 1, p. 97-101, 2011.

MAEDA H.; DELLAPENNA, D. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.260-265, 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 29 mar. 2013. doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.006.

MARTINS, L. P., SILVA, S. M., SILVA, A. P., CUNHA, G. A. P., MENDONÇA, R., VILAR, L. C. & LACERDA, J. T. Conservação pós-colheita de abacaxi 'Pérola' produzido em sistemas convencional e integrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, 2012.

MEHLER, A.H. Studies on the reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.34, p.339-351, 1951. Disponível em: <http://ac.els-00000aacb35e&acdnat=1346877425_840a1694fa8d0eb720add38c8c76d016>. Acesso em: 21 jul. 2011. doi: 10.1016/0003-9861(51)90012-4.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.9, p.405-410, 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1360138502023129/1-s2.0-S1360138502023129-main.pdf?_tid=18fce1ee-f799-11e1-9e23-00000aacb35f&acdnat=1346877451_8e3e01c159c2ce299d9a230bd1cd09e8>. Acesso em: 25 ago. 2012. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.

MONTERO-CALDERÓN, M., ROJAS-GRAÜ, M. A., & MARTÍN-BELLOSO, O. Effect of packaging conditions on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). **Postharvest biology and technology**, v. 50, n. 2, p. 182-189, 2008.

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A.N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Cap.6, p.101-128.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., & FOYER, C. H. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. **Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 1636-1648, 2014.

NUKUNTORNPRAKIT, O. A., CHANJIRAKUL, K., VAN DOORN, W. G., & SIRIPHANICH, J. Chilling injury in pineapple fruit: Fatty acid composition and antioxidant metabolism. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 20-26, 2015.

OMOTOSO, S. O., & AKINRINDE, E. A. Effect of nitrogen fertilizer on some growth, yield and fruit quality parameters in pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) plant at Ado-Ekiti Southwestern, Nigeria. **International Research Journal of Agricultural Science and soil Science**, v. 3, n. 1, p. 11-16, 2013.

PATHAVEERAT, S., TERDWONGWORAKUL, A., & PHAUNGSOMBUT, A. Multivariate data analysis for classification of pineapple maturity. **Journal of Food Engineering**, v. 89, n. 2, p. 112-118, 2008.

PEGORARO, R. F., SOUZA, B. A. M. D., MAIA, V. M., SILVA, D. F. D., MEDEIROS, A. C., & SAMPAIO, R. A. Macronutrient uptake, accumulation and export by the irrigated 'vitória' pineapple plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 3, p. 896- 904, 2014.

PIZA, I.M.T. et al. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n.4, p.361-366, 2003. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v9n4/artigo09.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, v. 68, n. 1, p. 125-131, 2013.

RAIMBAULT, A. K., MARIE-ALPHONSINE, P. A., HORRY, J. P., FRANCOISHAUGRIN, M., ROMUALD, K., & SOLER, A. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 1, p. 342-348, 2010.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; NANDAKUMAR, N.; PALANISWAMI, R.; NISHIGAKI, Y.; NISHIGAKI, I. . Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, v. 86, p. 103-112, 2014.

RONSEIN, G.E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v.29, n.3, p.563-568, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000300027>. Acesso em: 11 jul. 2012. doi: 10.1590/S0100-40422006000300027.

SERKEDJIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. En fi eld: Science Publishers, 2011. Chap.13, p.275-293.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012,

p.1-26, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>. Acesso em: 04 out. 2012. doi: 10.1155/2012/217037.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTOS S. A.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SOARES, A. G., TRUGO, L. C., BOTREL, N., & DA SILVA SOUZA, L. F. Reduction of internal browning of pineapple fruit (*Ananas comusus* L.) by preharvest soil application of potassium. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, n. 2, p. 201-207, 2005.

SPIRONELLO, A., QUAGGIO, J. A., TEIXEIRA, L. A. J., FURLANI, P. R., & SIGRIST, J. M. M. Pineapple yield and fruit quality effected by NPK fertilization in a tropical soil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 155-159, 2004.

TANG, K. C. S.; KONCZAK, I.; ZHAO, J.. Identification and quantification of phenolics in Australian native mint (*Mentha australis* R. Br.). *Food chemistry*, v. 192, p. 698-705, 2016.

TEIXEIRA, L. A. J., QUAGGIO, J. A., CANTARELLA, H., & MELLIS, E. V. Potassium fertilization for pineapple: effects on plant growth and fruit yield. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 618-626, 2011.

TRANTAPHYLIDES C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. **Trends in Plant Science**, v.14, n.4, p.219-229, 2009. Disponível em: <<http://www.cell.com/trend/retrieve/pii/S1360138509000727>>. Acesso em: 23 jul. 2012. doi:10.1016/j.tplants.2009.01.00.

VASS I.; CSER, K. Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. **Trends Plant Science**, v.14, p.200-205, 2009. Disponível em: <<http://www.cell.com/trends/plant-science//retrieve/pii/S1360138509000715>>. Acesso em: 21 jul. 2012. doi:10.1016/j.2009.01.009.

WU, D., & SUN, D. W. Colour measurements by computer vision for food quality control—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 5-20, 2013.

WU, G. L., CUI, J., TAO, L., & YANG, H. Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 124-132, 2010.

ZHANG, B., HUANG, W., LI, J., ZHAO, C., FAN, S., WU, J., & LIU, C. Principles, developments and applications of computer vision for external quality inspection of fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, v. 62, p. 326-343, 2014.

CAPÍTULO III

Atividade da bromelina em extratos da polpa, talo, casca e coroa de infrutescências de abacaxizeiros ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’

Será submetido: Revista Brasileira de Fruticultura

BARROS, T. F. S. **Atividade da bromelina em extratos da polpa, talo, casca e coroa de infrutescências de abacaxizeiros ‘Pérola’, ‘Vitória’, e ‘Imperial’**. Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Trabalho de Tese em Agronomia. Orientadora: Profª. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

RESUMO

A bromelina é uma protease com relevância na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e biotecnológica, de alto valor comercial, que pode ser obtida a partir de resíduos do abacaxizeiro. Em virtude da crescente demanda pelo uso de enzimas com aplicação industrial e terapêutica, objetivou-se nesse trabalho realizar uma caracterização bioquímica referente à atividade da bromelina em extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxizeiro ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’. Os abacaxis foram adquiridos na maturidade comercial, caracterizada pelas malhas da base levemente alaranjadas na base da fruta, em quatro repetições de 20 frutos/variedade (Pérola, Vitória e Imperial). Os frutos foram provenientes de diferentes municípios produtores de abacaxi localizados Mata Paraibana e transportados ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Foi estimada a atividade proteolítica da Bromelina utilizando caseína a 2% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5); o teor de proteína total foi determinado pelo método de Bradford; e a atividade específica da bromelina por uma relação existente entre atividade proteolítica e o teor proteico. Para a verificação da expressão do complexo proteico bromelina foi realizada a técnica de eletroforese SDS-PAGE. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Realizou-se também uma análise de componentes principais (PCA) a fim de se verificar a similaridade ou discriminação, segundo a formação de agrupamentos das amostras. Em relação à atividade proteolítica para a porção polpa, o abacaxi ‘Pérola’ apresentou maior média, seguido do ‘Imperial’ e ‘Vitória’; comportamento semelhante foi observado para a porção talo, entretanto para as porções casca e coroa, a cv. ‘Imperial’ se destacou em detrimento as cultivares ‘Pérola’ e ‘Vitória’, respectivamente. Quanto a atividade específica, houve variação de média de 53 U.mg⁻¹ para a porção talo da cv. ‘Vitória’ a 453 U.mg⁻¹ para a porção polpa de ‘Pérola’. A variabilidade da bromelina existente nas diferentes porções estudadas foi explicada, em 99%, por duas componentes principais, a CP-1 = 74% e a CP-2 = 25%. Os principais componentes de proteínas nos extratos das porções polpa, talo, casca e coroa das três variedades de abacaxi estudadas apresentaram peso molecular de aproximadamente 24

kDa para as variedades Pérola e Vitória e 26 kDa para Imperial. As porções coroas e cascas configuram melhor fonte de bromelina que as porções polpa e talo para as variedades Vitória e Imperial. Neste contexto, ressalta-se a importância da utilização dos resíduos industriais do processamento do abacaxi, que usualmente são descartados, para a obtenção da bromelina. Essa prática representaria uma significativa redução na quantidade de lixo gerado pelas indústrias de conservas e sucos de abacaxi, contribuindo para a adequada manutenção do meio ambiente, além de outra fonte de receita para as indústrias que utilizam a bromelina como matéria-prima.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, resíduos agroindustriais, bromelina.

BARROS, T. F. S. **Bromelain activity in pulp, stem, bark and crown extracts of 'Pérola', 'Vitória', and 'Imperial' pineapple infructes.** Areia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 2017, 127p. Trabalho de Tese em Agronomia. Orientadora: Profª. Ph.D. Silvanda de Melo Silva.

ABSTRACT

Bromelain is a protease which is relevant in the food, cosmetic, pharmaceutical and biotechnology industries, high commercial value which can be obtained from pineapple wastes. Given the growing demand for the use of enzymes with industrial and therapeutic application, is aimed in this study perform a biochemical characterization concerning the bromelain activity in pulp extracts, stem, shell, and crown of pineapple 'Pérola', 'Vitória' and 'Imperial'. Pineapples were purchased at the commercial maturity, characterized by slightly orange meshes at the base of the fruit, in four replicates of 20 fruits / variety (Pérola, Vitória and Imperial). The fruits came from different pineapple producing municipalities located in Mata Paraibana, Paraíba State, Brazil, and transported to the Laboratorio de Biologia e Tecnologia Pos-Colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. The proteolytic activity of bromelain using 2% casein in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) was estimated; the total protein content was determined by Bradford method; and the specific activity of bromelain by a relationship between proteolytic activity and protein content. To check the bromelain protein complex expression was performed electrophoresis SDS-PAGE. The data were submitted to ANOVA and means compared by the Tukey test at 5% probability. It carried out also a principal component analysis (PCA) in order to verify the similarity or breakdown by the formation of clusters of samples. Regarding the proteolytic activity to the pulp portion, pineapple 'Pearl' showed the highest average, followed by the 'Imperial' and 'Vitória'; similar behavior was observed for the stem portion, however for the shell portions and crown, the cv. 'Imperial' stood out over the 'Pérola' cultivars and 'Vitória', respectively. The specific activity, there was an average variation of 53 U.mg⁻¹ for cv. stem portion. 'Vitória' 453 U.mg⁻¹ for the portion pulp 'Pérola'. The variability existing in different portions of bromelain was explained studied, 99% for two main components, CP-1 = 74% and CP-2 = 25%. The principal components of proteins in extracts from flesh parts, stalk, bark and crown of the three studied pineapple varieties had a molecular weight of approximately 23 kDa.

Keywords: Ananas comosus, agro-industrial waste, bromelain.

1. INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma fruta das regiões tropicais e subtropicais, com ampla aceitação no mercado consumidor, tanto ao natural quanto na forma de produtos industrializados. Este fruto é extensivamente cultivado em diversos países, e no Brasil assume grande importância econômica. Dados da FAO (2014) indicam o abacaxi como a terceira fruta tropical mais produzida no mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial, superando apenas a Tailândia.

A produção brasileira de abacaxis na safra de 2015 atingiu 1.767.267 mil frutos, em uma área plantada de 103.233 hectares, apresentando um rendimento médio de 29.986 frutos por hectare (IBGE, 2016), entretanto, do abacaxizeiro apenas o fruto é comercializado, sendo as cascas, talos, coroa e folhas considerados resíduos pelas indústrias de sucos e conservas. Estes resíduos constituem fontes importantes de enzimas proteolíticas, a exemplo da bromelina, que vem despertando expressivo interesse científico.

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nas plantas da família da Bromeliaceae, da qual o abacaxi é o mais conhecido (NADIZARAH et al., 2014). A bromelina tem tido ampla aplicação na indústria de alimentos, mas ela pode ser utilizada também em indicações clínicas, tais como: agentes antitumorais, modulação imune, limpeza de feridas, aumento do efeito de antibióticos, ação anti-inflamatória, ação mucolítica, auxílio na digestão, aplicações em doenças cardiovasculares e circulatórias, em procedimentos cirúrgicos e ferimentos da musculatura esquelética (AICHELE et al., 2013).

Na indústria de alimentos, a bromelina pode ser utilizada no amaciamento de carnes vermelhas, na produção de pães e biscoitos a partir de farinhas de trigo de alto teor de proteínas, na produção de ovos desidratados, na preparação de leite de soja e isolados proteicos, na cervejaria para hidrolisar certos complexos proteína-tanino, formados durante a fermentação, que se presente na cerveja, tornam-se insolúveis e formam turvações quando gelada (SABAA, 1999). Dentre as inúmeras vantagens de sua utilização, merece destaque o fato delas serem ecologicamente mais viáveis, pois pode ser obtida a partir de resíduos agrícolas e agroindustriais do abacaxizeiro (NADIZARAH et al., 2013).

Com o advento da biotecnologia nos últimos anos, o desenvolvimento de novas estratégias de obtenção e utilização de matérias primas foi facilitado. Matérias primas estas antes sem destino. Em decorrência destas necessidades e tendências, é notório o aumento significativo do consumo e demanda de produção de enzimas em nível internacional, por possuírem amplas aplicações industriais e terapêuticas. Este cenário é particularmente importante para o Brasil, país que necessita inserir-se de forma mais representativa como usuário e provedor de enzimas e tecnologia enzimática (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido em processos industriais quando comparado com outros países. As proteases, por exemplo, são as enzimas consideradas mais importantes de todas as enzimas industriais e compreendem cerca de 60% das enzimas utilizadas. Apresentam importância nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica e até no processamento do couro (GONZALEZRÁBADE et al., 2011; BALA et al., 2012). As proteases podem ser obtidas a partir de diversas fontes, destacando-se as de origem microbiana, animal e vegetal. O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem constituir fontes inesgotáveis de enzimas (RAO, 1998; FATIBELLO; VIEIRA, 2002).

Diferentes partes do abacaxi podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina tais como, folhas, talos, polpa da fruta, cascas, coroas e resíduos industriais do processamento da polpa do fruto (HEBBAR et al., 2012). A bromelina comercial é um produto de alto valor agregado e não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta, rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Esta é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi (LOPES et al., 2012).

O Brasil diferencia-se completamente dos grandes produtores e consumidores mundiais de abacaxi, pois quase toda sua produção é consumida na forma fresca, sendo a quantidade industrializada praticamente insignificante (BERTEVELLO, 2001). Uma das principais fontes de matérias prima para a extração de enzimas proteolíticas no Brasil, não seriam os subprodutos do processamento da fruta e sim os resíduos agrícolas, especialmente o caule que tem demonstrado bons resultados nos mais recentes estudos de extração de enzimas e nas aplicações terapêuticas da bromelina (CESAR et al., 2005).

Com o surgimento de novas variedades de abacaxizeiro, a exemplo da cv. ‘Vitória’ e ‘Imperial’, que são resistentes à fusariose, novas fontes potenciais de obtenção de bromelina podem ser explorados no intuito de avaliar concentrações e rendimento da enzima (VENTURA et al., 2009). Diante disto, foi proposto nesse trabalho explorar aspectos que pudessem gerar agregação de valor ao agronegócio de abacaxi e reconhecimento científico através da avaliação da atividade enzimática e proteolítica de extratos de polpa, talo, casca e coroa de três variedades distintas de abacaxizeiro procedentes de diferentes regiões da Zona da Mata do estado da Paraíba nas atividades enzimática e proteolítica.

2. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização bioquímica referente à atividade da bromelina em extratos da polpa, talo, casca e coroa de infrutescências de abacaxizeiro ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar o teor de proteínas totais, atividade proteolítica e atividade específica de bromelina nos extratos da polpa, talo, casca e coroa das infrutescências de abacaxizeiros das cultivares ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Quantificar a atividade da bromelina em extratos de polpa, talo, casca e coroa das infrutescências de abacaxizeiros das cultivares ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’;
- ✓ Concentrar os extratos de bromelina através de processos de liofilização;
- ✓ Obter o perfil de proteínas através de técnicas de eletroforese de SDS-PAGE;
- ✓ Interrelacionar as diferenças entre os extratos de polpa, talo, casca e coroa das infrutescências de abacaxizeiros Pérola, Vitória e Imperial, de modo a identificar as características que influenciam na variabilidade dessas cultivares.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Obtenção e Procedência dos Frutos:

O experimento consistiu na obtenção de 60 frutos adquiridos diretamente dos produtores, sendo estes divididos em 20 frutos de três diferentes cultivares de abacaxizeiro (Pérola, Vitória e Imperial), correspondendo dessa forma as repetições por tratamento / cultivar. Os frutos de Abacaxi 'Pérola' foram provenientes do distrito de Odilândia, localizado no município de Santa Rita, os frutos 'Vitória' do município de Araçagi, e os frutos 'Imperial' do município de Alhandra, todos localizados no brejo do estado da Paraíba. Os critérios de adubação e a análise dos solos foram definidos com base nas recomendações dos boletins técnicos para abacaxizeiro dos estados da Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia e Ceará. Os frutos selecionados em estágio de maturação adequado para o consumo, caracterizado por cor verde com manchas amarelas na base do fruto foram transportados ao Laboratório de Biologia e Tecnologia Pós-colheita do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, onde foram higienizados e em seguida separados em partes (polpa, talo, casca e coroa). As amostras foram cortadas em cubos de aproximadamente 1 cm^3 , sendo armazenadas em pacotes com aproximadamente 100g cada e acondicionadas em temperatura de -80°C . Para os ensaios, as amostras foram descongeladas e utilizadas no mesmo dia.

3.2 Características Avaliadas

3.2.1 Atividade Proteolítica da Bromelina ($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$):

Foi estimada de acordo com o método de Kunitz (1947) e Walter (1984), usando como substrato caseína 2% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5).

3.2.2 Obtenção do Extrato Bruto:

A obtenção do extrato bruto da bromelina foi realizada conforme descrito por Lopes et al., (2013) com modificações. As amostras foram adicionadas tampão fosfato 1M, em proporção de 1:1 (10g:10mL) para a porção talo, 1:3 (2g:6mL) para as porções, casca e coroa, e 1:5 (5g:25mL) para a porção polpa. A solução tampão foi preparada a

partir de soluções de estoque de fosfato monobásico de potássio e fosfato dibásico de potássio, conforme descrito por Morita e Assumpção (1986). A mistura foi homogeneizada em almofariz durante três minutos e posteriormente a mistura foi filtrado em papel Whatman nº1 para retenção de fibras e sólidos dispersos e, em seguida o pH do meio foi ajustado a 7,5 com NaOH 1M.

3.2.3 Caracterização da Bromelina (U.min⁻¹. mL⁻¹):

Foi adicionado 0,2 mL do extrato bruto da enzima a 2,5 mL de solução caseína, deixando em repouso por 10 minutos a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de ácido tricloroacético 0,3 M, promovendo a precipitação do substrato não hidrolisado, e deixado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 4000xg por 20 minutos, a quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético foi determinada a 280 nm contra um branco do substrato e um branco da amostra. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 minutos a 37 °C.

Foi realizado o branco da amostra (substituindo a amostra por HCL 0,05 M) e o branco do aparelho (substituindo a caseína e a amostra por HCL 0,05 M). A calibração do espectrofotômetro (GenesysTM 10s UV VIS) foi realizada utilizando o branco do aparelho e a leitura feita a 280 nm em cubetas de quartzo. A atividade proteolítica foi determinada através da seguinte equação:

$$\text{Atividade Proteolítica (U. min}^{-1}\text{. mL}^{-1}\text{)} = \left(\frac{C_{tir}}{T} \right) \div al * 1000$$

Onde:

$C_{tir} \rightarrow y = ax$, sendo $y = \text{absA} - \text{absBA} - \text{absBS}$;

absA – absorbância da amostra;

absBA – absorbância do branco da amostra;

absBS – absorbância do branco do substrato;

T = tempo de reação a 37 °C;

al = alíquota do extrato bruto utilizada;

A atividade enzimática foi expressa como unidades de enzima por mL de extrato bruto.

3.2.4 Teor de Proteína Total (mg.g⁻¹):

Determinado pelo método de Bradford (1976). Foram utilizadas alíquotas de 50 µL (casca e coroa) a 200 µL (polpa e talo) do extrato proteico com 2 mL do reagente de Bradford em tubo de ensaio. Quando se utilizou alíquotas menores que 200 µL do extrato, completou-se o volume com água destilada. Estas alíquotas foram definidas com base em curva-padrão de BSA, considerando a leitura de absorbância com base na faixa de linearidade da curva padrão. Foram preparadas soluções de padrão de BSA com diferentes concentrações (variando de 0 a 100 µg proteína.mL⁻¹ tampão). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por agitação, mantendo em repouso por 5 minutos. Procedeu-se a leituras das amostras em (GenesesTM 10s UV VIS), a 595 nm.

$$\text{Teor proteico (mg.g}^{-1}\text{)} = x * \frac{FD1 * FD2}{1000}$$

Onde:

x = Calculado a partir da equação da curva padrão de BSA (µg. mL⁻¹), usando a absorbância da amostra como valor y;

FD1 (g.mL⁻¹) = Vol. tampão de extração (3 mL) / massa de polpa (g);

FD2 = Vol. final da mistura no tubo de reação (extrato + água destilada) – 0,2 mL / vol. da alíquota utilizada.

3.2.5 Atividade Específica das Enzimas Proteolíticas (U.mg⁻¹):

Foi determinado pela relação existente entre atividade proteolítica em U.min⁻¹.mL⁻¹ e o teor proteico em mg.mL⁻¹.

$$\text{Atividade Específica} = \frac{\text{Atividade Proteolítica (U.min}^{-1}\text{.mL}^{-1}\text{)}}{\text{Teor protéico (mg.mL}^{-1}\text{)}}$$

3.2.6 Eletroforese

A técnica de eletroforese por SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por Lammeli (1970). Para tanto, as amostras de proteínas foram solubilizadas em tampão de Tris-HCl 0,0625 M, contendo 2% de SDS, 2% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,010% azul de bromofenol, seguidas pela aplicação de uma alíquota no gel empilhamento de 4 g/100 g e 12,5 g/100 g em gel de corrida de poliacrilamida (10 x 10,5 cm, com espaçadores de 0,30 mm), submetido a uma corrente constante de 25 mA por aproximadamente 3 horas.

Após a eletroforese o gel fixado com solução fixadora metanol/ácido acético e água, seguido de coloração segundo procedimento descrito por Weber e Osbone (2,000). A solução corante foi preparada usando-se Coomassie Blue R-250 (Sigma Chemical Co.) a 1%, metanol 40%, ácido acético 10% em água destilada. O descoramento foi feito com uma solução contendo ácido acético 10% e metanol 20% em água destilada. Para estimar o peso molecular, foi utilizado padrão comercial (Sigma Chemical Co.), de ampla faixa de proteínas conhecidas (Miosina, 200 kDa; β -galactosidase, 120 kDa; Soro Bovino, 91 kDa; Glutamina, 62 kDa; Ovoalbumina, 46 kDa; Anidrase Carbônica, 38 kDa; Mioglobina, 26 kDa; Lisozima, 19 kDa; Aprotinina, 9 kDa).

3.3 Análise Estatística

As análises estatísticas referentes às análises de proteínas, atividade proteolítica e atividade específica de bromelina das porções (polpa, talo, casca e coroa) das variedades Pérola, Vitória e Imperial foram realizadas em conjuntos, estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias das variedades foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Sisvar[®] versão 5.1 (2007). Visando determinar quais dos parâmetros avaliados são significativamente diferentes nas referidas amostras estudadas.

Realizou-se também uma análise de componentes principais (PCA) a fim de se verificar a similaridade ou discriminação, segundo a formação de agrupamentos das amostras a partir do teor de proteína total e da atividade proteolítica e específica da bromelina. Para tanto utilizou-se do método de validação cruzada total (leave-one-out). O conjunto de amostras foi construído a partir dos extratos de polpa, talo, casca e coroa

de abacaxis ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial, perfazendo um total de 60 amostras sendo 20 amostras em três repetições por cultivares de abacaxi estudado. O software The Unscrambler X.2 foi empregado na análise estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinações da Atividade Proteolítica e Específica da Bromelina

A escolha do tampão de extração e razão de diluição para a determinação da atividade proteolítica da bromelina e teor de proteína total em extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi teve como base a curva padrão de tirosina ($R^2 = 0,99$) (Figura 4). Foi observado maior absorvância para todas as razões de diluições (1:1, 1:3, 1:5 e 1:10 – g:mL) do extrato quando se utilizou tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 6, e a menor absorvância foi verificada quando se utilizou tampão fosfato de potássio a 0,1 M e pH 7,0. Em relação à razão de diluição, a leitura de absorvância foi proporcional à concentração do soluto. Portanto, com base na curva padrão de tirosina, utilizada para calcular a atividade proteolítica da bromelina dos extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’, considerando a leitura de absorvância da amostra dentro da faixa de linearidade, foi selecionado como tampão de extração, o fosfato de potássio a 0,1 M e pH 7,0 na proporção 1:1 (10g:10mL) para a porção talo, 1:3 (2g:6mL/1g:3mL) para as porções, casca e coroa, e 1:5 (5g:25mL) para a porção polpa que apresentaram leitura média de absorvância a 280 nm de 0,262, 0,318, 0,387 e 0,262 respectivamente.

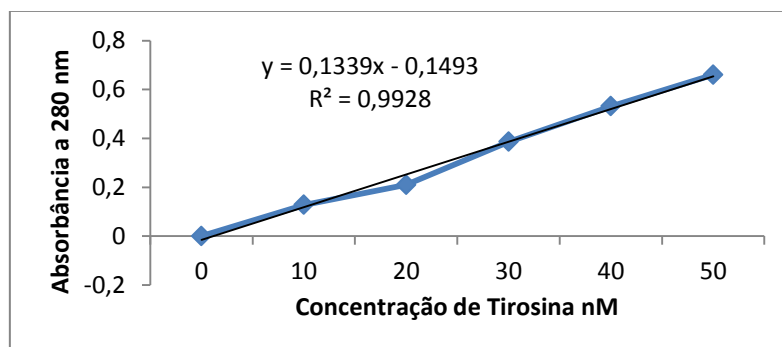


Figura 1: Curva padrão de Tirosina utilizada como base para a definição das alíquotas dos extratos de bromelina em polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’.

A seleção do tampão de extração e razão de diluição para a determinação de proteína total pelo método de Bradford de extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi foi realizada com base na curva padrão de BSA ($R^2 = 0,99$) (Figura 5). Dessa forma, foi selecionado o tampão com pH 6,3 e razão de diluição 0,5:3 (g de polpa: mL do tampão) para a determinação de proteína total de polpa de abacaxi Vitória, que apresentou leitura de absorvância de 0,343. Clavico et al., (2012), em estudo sobre a

cinética da bromelina extraída de abacaxi ‘Perolela’, verificaram pH ótimo para a atividade proteolítica entre 6,0 e 8,0 em tampão fosfato. Santos et al., (2009) reportaram para a bromelina presente no extrato proteico da infrutescência de abacaxi ‘Pérola’, pH ótimo de 5,0 em tampão acetato de sódio. Já para as porções casca e coroa da cultivar ‘Pérola’, Lopes et al., (2013) mostraram que a maior atividade proteolítica foi observada no tampão de extração fosfato pH 7,0. Para os extratos de coroa, casca, talo e caule, o pH ótimo para a bromelina variou de 6,0 a 8,0 (KETNAWA et al., 2012).

A concentração do pH pode afetar as interações intermoleculares entre os resíduos de aminoácidos da bromelina, fazendo com que a enzima perca a estrutura terciária, passando, assim, a apresentar mudanças no sítio ativo e, consequentemente, perder a atividade (Cesar, 2005; Thé, 2010; Costa e Fernandes e Ventura, 2012). A bromelina é uma cisteína protease e possui grupos sulfidríla (-SH) no sítio ativo que podem sofrer oxidação para formar pontes dissulfeto. Este processo conduz a clivagem autoproteolítica e, portanto, a perda de atividade. Segundo Costa e Fernandes e Ventura (2012) o uso de produtos químicos (tais como sais de sulfetos e sulfatos) para proteger o grupo sulfidrílo, com um mínimo de ação oxidante na solução de extração, melhora a solubilidade da proteína preservando, dessa forma a atividade da bromelina. Thé (2010) recomenda o uso de Na_2SO_4 em solução de extração para proteger o sítio ativo da bromelina e, assim, manter a atividade desta enzima.

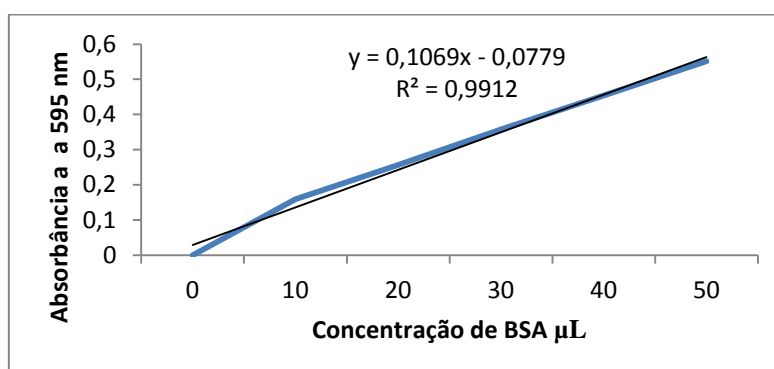


Figura 2: Curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) e absorbância a 595 nm da solução de determinação de proteína total, utilizando extratos proteicos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’.

A atividade proteolítica ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) do extrato da polpa da cultivar de abacaxi ‘Pérola’ diferiu da Vitória e da Imperial, com média de $43,37 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. A variedade Vitória apresentou valores em média de $16,48 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ inferiores a variedade Imperial que apresentou média de $26,66 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente,

conforme apresentado na tabela 4. Os valores da atividade proteolítica para a porção polpa neste trabalho foram inferiores aos reportados por Dantas et al., (2014), que ao trabalharem com abacaxi ‘Vitória’ submetidos a diferentes dosagens de Nitrogênio, relataram valores variando de 23,25 a 53,42 U.min⁻¹.mL⁻¹. Abílio et al., (2009) trabalhando com abacaxis híbridos produzidos na Paraíba (Emepa-01, Imperial e MD-2) e com cultivares tradicionalmente cultivadas (Pérola e Smooth Cayenne), reportaram maior atividade proteolítica da bromelina na porção polpa, nos frutos híbridos, e apresentaram médias com uma variação de 5,54 U.min⁻¹.mL⁻¹ para ‘Smooth Cayenne’ a 56,41 U.min⁻¹.mL⁻¹ para a ‘Imperial’. Em trabalho conduzido com diferentes fases de maturação do abacaxi ‘Pérola’ e ‘Vitória’ Costa et al., (2014) observaram que a variedade Pérola apresentou níveis significativamente mais elevados de atividade proteolítica, teor de proteína total e atividade específica da bromelina quando comparada a variedade Vitória.

Comparando as três cultivares estudadas neste trabalho, a atividade específica da bromelina para a porção polpa foi maior na cv. Pérola com média de 453 U.mg⁻¹, seguido de 314 U.mg⁻¹ para ‘Imperial’ e 256 U.mg⁻¹ para a cv. ‘Vitória’. Chaurasiya e Hebbar (2013) reportaram que nas variedades Pérola e Vitória durante todo o processo de maturação, a atividade específica da bromelina apresentou as mesmas características. Entretanto, Amid et al., (2011) afirmou que a enzima não está presente durante as fases iniciais do desenvolvimento do fruto; contudo, o nível da atividade enzimática aumenta rapidamente à medida que a fruta amadurece, permanece alto, e diminui ligeiramente durante a fase final da maturação. Portanto a presença de bromelina depende da fase de crescimento da planta, e a enzima não é encontrada em plantas extremamente jovens ou muito velhas. Dessa forma, a bromelina é provavelmente convertida em outra proteína possuindo uma função metabólica diferente, tal como sabor, ou aroma durante a fase final da maturação (Cesar et.al., 2005).

Para o extrato da porção talo das variedades estudadas, a atividade proteolítica apresentou maior média de 5,63 U.min⁻¹.mL⁻¹ para abacaxi ‘Pérola’, seguida de 4,59 U.min⁻¹.mL⁻¹ ‘Imperial’ e 3,19 U.min⁻¹.mL⁻¹ ‘Vitória’. No que diz respeito à atividade específica para a porção talo valores semelhantes entre as variedades foram encontrados, 59 U.mg⁻¹, 53 U.mg⁻¹ e 54 U.mg⁻¹ para ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’, respectivamente. As diferenças entre os valores da proteína total, atividade proteolítica e específica da bromelina observados em literatura podem ser atribuída a diferenças no cultivo, solos, e condições climáticas. Os valores também podem ser diferentes devido

aos vários tampões utilizados para extrair a enzima. Fatores tais como o tipo e pH do tampão de extração podem levar a uma perda da estrutura tridimensional destas moléculas complexas, causando conseqüentemente uma perda parcial ou total da atividade enzimática (César, 2005; Thé, 2010; Costa e Fernandes e Ventura, 2012).

Em relação à atividade proteolítica do extrato da casca, a variedade Imperial foi a que apresentou maiores valores com médias de $30,51 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ e atividade específica de 304 U.mg^{-1} , seguida da cv. 'Pérola' com média de $17,48 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ para atividade proteolítica e 172 U.mg^{-1} para atividade específica. A variedade Vitória foi a que menos se destacou, apresentando os menores valores em média, $9,59 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ para a atividade proteolítica e 126 U.mg^{-1} para atividade específica. Abílio et al., (2009) trabalhando com diferentes variedades de abacaxis produzidos na Paraíba, observaram maior atividade proteolítica e específica da bromelina na porção casca nas variedades Imperial e Pérola, com valores em média de 68,56 e 61,83 U/mL de extrato bruto para atividade proteolítica e 6,59 e 10,01 U/mg de proteína para atividade específica de bromelina, respectivamente. Os menores valores, ainda apresentados por Abílio et al., (2009) foram para as variedades Emepa-0,1 e Smooth Cayenne, com médias de 22,95 e 23,04 U/mL de extrato bruto para atividade proteolítica e 3,81 e 2,72 U/mg de proteína para atividade específica de bromelina, respectivamente. César (1999), analisando abacaxi 'Pérola', verificou atividade proteolítica da bromelina igual a 0,86 U/mL para a porção casca, valores bastante inferiores aos encontrados neste estudo, provavelmente decorrentes das diferenças de cultivo, solo e condições climáticas entre os estados da Paraíba e São Paulo.

Padrão semelhante ao da porção casca foi encontrado para a porção coroa nas três variedades estudadas, conforme apresentado na tabela 4. A maior atividade proteolítica e específica da bromelina foi encontrada na cv. 'Imperial', com média de $41,79 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ e 394 U.mg^{-1} , respectivamente, seguida da cv. 'Pérola', $31,27 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ para atividade proteolítica e 228 U.mg^{-1} para atividade específica, e da cv. 'Vitória' com $12,16 \text{ U.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ e 228 U.mg^{-1} , respectivamente. A atividade específica da bromelina nas porções casca e coroa foram significativamente mais elevadas quando comparadas com as porções polpa e talo, configurando-se como a melhor fonte de bromelina para as variedades Imperial e Vitória. A cv. 'Pérola' apresentou valores superiores de atividade específica de bromelina na porção polpa. Konno et al. (2004) afirmam que as enzimas proteolíticas da classe cisteína-peptidase estão relacionados com principais mecanismos de defesa das plantas. Dessa forma, os resultados deste

trabalho também indicam uma possível relação entre a elevada atividade específica de bromelina nestas variedades de abacaxi e a resistência à fusariose. Jung et al. (2008) ao super expressar o gene da bromelina em couve chinesa notaram que, as plantas que expressavam bromelina apresentavam uma resistência a *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, bactéria causadora da podridão mole, doença responsável por causar sérios danos a plantas e perdas econômicas em muitas culturas tais como, cenoura, rabanete, batata e couve.

Tabela 1: Teor de proteínas, atividade proteolítica e específica da bromelina em extratos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi Pérola, Vitória e Imperial, colhidos em maturidade comercial.

Variedade	Porções	Atividade Proteolítica (U.min ⁻¹ .mL ⁻¹)	Proteína Total (mg.g ⁻¹)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)
Pérola	Polpa	43,37	1,04	453
	Talo	5,63	1,09	59
	Casca	17,48	1,11	172
	Coroa	31,27	1,35	228
Vitória	Polpa	16,48	0,75	256
	Talo	3,19	0,70	53
	Casca	9,59	0,89	126
	Coroa	12,16	0,88	148
Imperial	Polpa	26,66	0,94	314
	Talo	4,59	0,98	54
	Casca	30,51	1,11	304
	Coroa	41,79	1,22	395

A variabilidade da bromelina existente nas diferentes porções estudadas, quanto as variáveis relacionadas ao teor de proteína total e atividade proteolítica e específica da bromelina, foi explicada, em 99 %, por duas componentes principais, a CP-1= 74% e a CP-2= 25% conforme apresentado na figura 6.

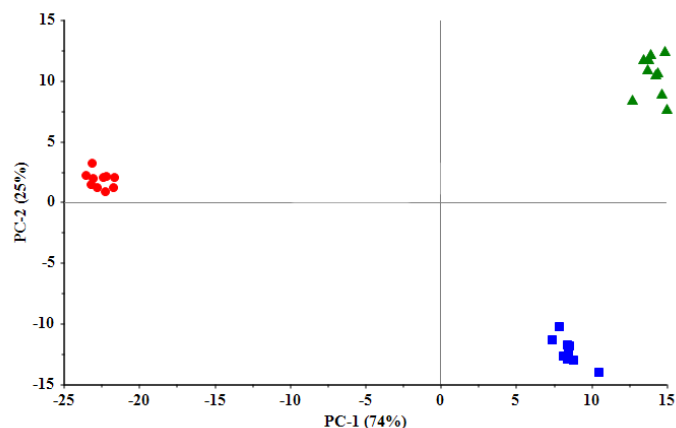


Figura 3: Representação dos escores com 100% de variância explicada para PC-1 (74%) vs PC-2 (25%) em extratos proteicos de polpa, talo, casca e coroa de abacaxi ‘Pérola’(azul) ‘Vitória’ (vermelho) e ‘Imperial’ (verde), colhidos em maturidade comercial.

A PC1 discrimina a variedade Vitória das demais e a PC2 separa as variedades de abacaxi Pérola e Imperial. Para esta PCA, a diferença entre estas variedades de abacaxi deve-se principalmente à proporção da atividade proteolítica e específica da bromelina determinada nas porções polpa, talo, casca e coroa dos abacaxis ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’, como representado no gráfico dos *loadings*, representados na Figura 7.

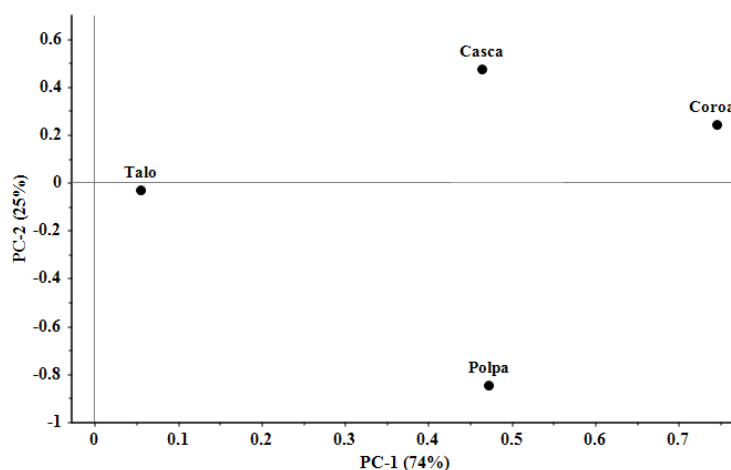


Figura 4: Representação dos loadings em relação à proporção da atividade proteolítica e específica da bromelina determinada nas porções polpa, talo, casca e coroa dos abacaxis ‘Pérola’, ‘Vitória’ e ‘Imperial’, colhidos em maturidade comercial.

4.2 Eletroforese de proteínas

Para a verificação da expressão da bromelina foi realizada a técnica de eletroforese sob condições desnaturantes com base no peso molecular, empregando marcadores moleculares, conforme proposto por Laemmli (1970). Os resultados encontrados para os padrões de proteínas das porções analisadas de abacaxi Pérola, Vitória e Imperial em bandas no gel de poliacrilamida foram praticamente os mesmos, conforme pode ser observado na figura 8. Os principais componentes de proteínas nos extratos das porções polpa, talo, casca e coroa apresentaram peso molecular de aproximadamente 24 kDa para as variedades Pérola e Vitória e 26 kDa para Imperial. Sendo que as porções polpa, casca e coroa apresentaram maior intensidade nas bandas dos géis. Resultado semelhante foi encontrado por Umesh et al., (2008) que relataram a expressividade da bromelina extraída das porções polpa, casca e coroa de abacaxi em torno de 26 kDa utilizando também a análise de SDS-PAGE. Maurer (2001) relatou que a bromelina extraída do caule e da polpa dos frutos de abacaxi foram expressas em gel de poliacrilamida em torno de 23,8 e 23 kDa, respectivamente. Ketnawa et al., (2012), ao trabalharem com porções de polpa, casca e coroa de duas cultivares de abacaxi (*Nang Lae* e *Phu Lae*) procedentes da Tailândia, verificaram que a banda de proteína que apresentou uma maior intensidade foi a referente a porção coroa com peso molecular aproximado de 28 kDa e a de menor intensidade foi para a porção polpa com peso molecular aproximado de 18,3 kDa para as duas cultivares.

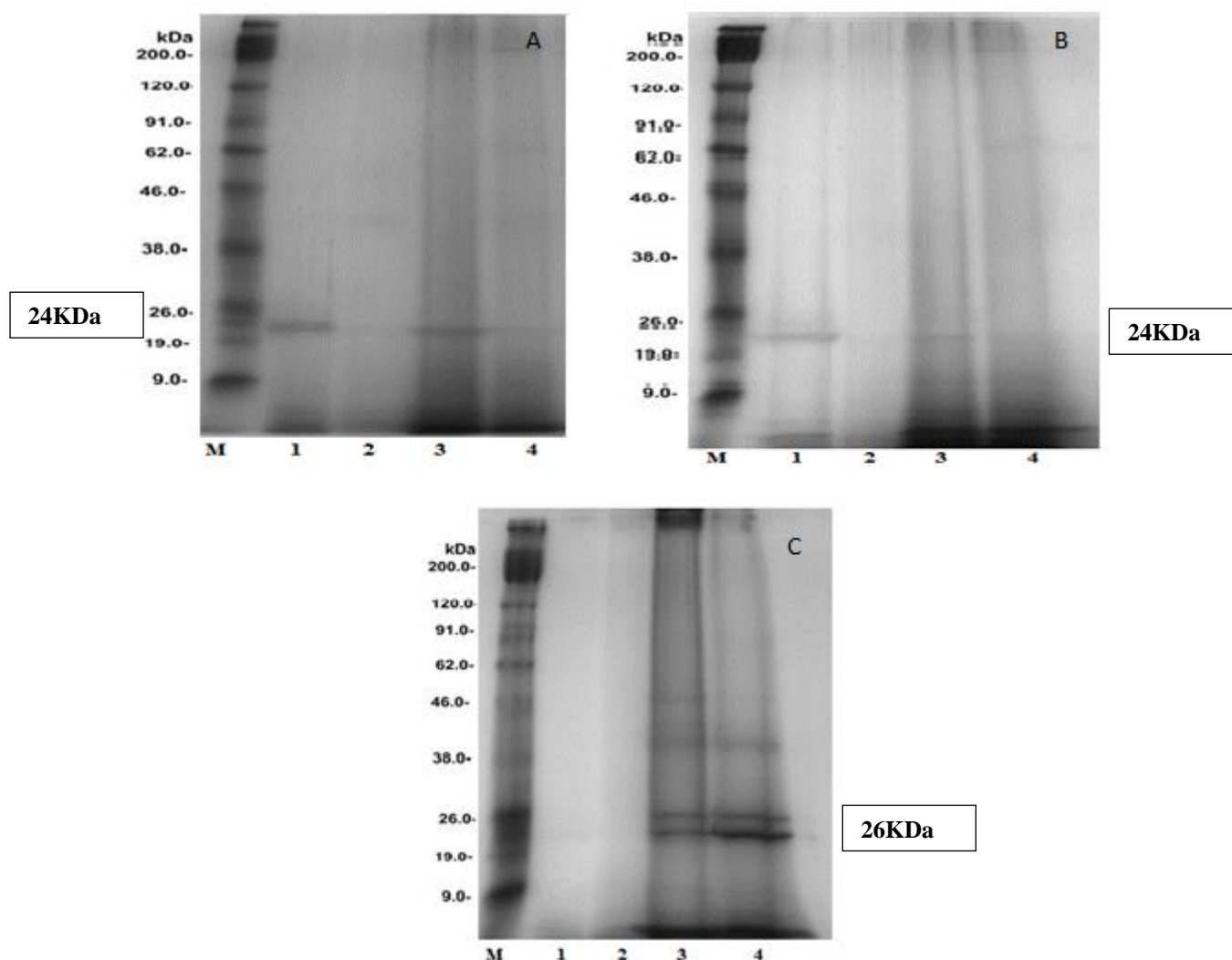


Figura 5: Eletroforese em gel de policrilamida em SDS das porções polpa, talo, casca e coroa dos abacaxis ‘Pérola’ (Figura A), ‘Vitória’ (Figura B) e ‘Imperial’ (Figura C), colhidos em maturidade comercial. **M** – Marcadores moleculares (Miosina, 200 kDa; -galactosidase, 120 kDa; Soro Bovino, 91 kDa; Glutamina, 62 kDa; Ovoalbumina, 46 kDa; Anidrase Carbônica, 38 kDa; Mioglobina, 26 kDa; Lisozima, 19 kDa; Aprotinina, 9 kDa); **1** – Porção polpa; **2** – Porção talo; **3** – Porção casca; **4** – Porção coroa.

Em um dos mercados mais promissores na indústria farmacêutica, a bromelina vem sendo aplicada na produção de medicamentos, sendo bem aceita como agente fitoterapêutico, como princípio ativo que auxilia na digestão, podendo substituir a pepsina e tripsina em tratamentos de insuficiência pancreática. Pode ser também usada na terapêutica de cardiopatias, artrite reumatóide, traumas cirúrgicos, edemas e sinusites; em terapias contra carcinomas, em função do aumento da lise celular, além de aumentar a ação de antibióticos se administrada concomitantemente (PIZA et al., 2002; BALA et al., 2012). Aplicada no tratamento de verminoses, por exemplo, *Ascaris* e *Trichuris*; desbridamento de feridas, nas queimaduras principalmente nas de 3º grau;

minimizar as dores menstruais, quando usada como solução de irrigação; bromelina também está envolvida na inibição da agregação plaquetária, bronquite, traumas cirúrgicos, pielonefrite (FREIMAN; SABAA, 1999; MAURER, 2001); usada como solução para preparação de suspensão de hemácias para tipagem sanguínea (CESAR, 2005). Recentemente, a bromelina foi relatada na melhora do microambiente de feridas causadas por armas de fogo (WU et al., 2012). Além disso, assume também posição na indústria de alimentos no que diz respeito à produção de amaciantes de carnes, processos de panificação, de queijos, clarificação de cerveja, prevenção do escurecimento do suco de maçã, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, de biscoitos a partir de farinha de trigo com alto teor protéico, produção de ovos desidratados, leite de soja, isolados proteicos. O FDA (*Food and Drug Administration*) qualificou bromelina como um aditivo alimentar sendo aceita com segurança (PIZA et al., 2002; TOCHI, 2008). Mais ainda, a bromelina tem sido utilizada como ingrediente ativo para fornecer efeitos de *peeling* suave na indústria de cosméticos. Tem sido utilizada também na indústria do couro para tratamento, amolecimento e liberação de peptídeos antimicrobianos de proteínas insolúveis. Em indústrias têxteis, a bromelina é usada para melhorar as propriedades de tingimento de fibras proteicas, decompondo a fibra parcialmente (WALSH, 2002 citado por BALA et al., 2012; AEHLE, 2007; SALAMPESSY et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

O teor de proteína total foi observado em maior destaque na porção coroa do abacaxi Pérola e em menor para a porção talo do ‘Vitória’; em relação à atividade proteolítica para a porção polpa, o abacaxi ‘Pérola’ apresentou maior média, seguido do ‘Imperial’ e ‘Vitória’; comportamento semelhante foi observado para a porção talo. Entretanto, para as porções casca e coroa, a cv. ‘Imperial’ se destacou em detrimento as cultivares ‘Pérola’ e ‘Vitória’, respectivamente; quanto a atividade específica, houve variação de média de 53 U.mg⁻¹ para a porção talo da cv. ‘Vitória’ a 453 U.mg⁻¹ para a porção polpa de ‘Pérola’.

Em relação à expressão da bromelina, os resultados encontrados para os principais componentes de proteínas nos extratos das porções polpa, talo, casca e coroa apresentaram peso molecular de aproximadamente 24 kDa para as cultivares Pérola e Vitória e 26 kDa para Imperial, sendo que as porções polpa, casca e coroa apresentaram maior intensidade de banda nos géis de poliacrilamida. Portanto, as porções coroas e cascas configuram melhor fonte de bromelina que as porções polpa e talo para as cultivares Vitória e Imperial.

Neste contexto, ressalta-se a importância da utilização das porções não comestíveis do abacaxi, que usualmente são descartados, para a obtenção da bromelina. Essa prática sustentável representaria uma significativa redução na quantidade de lixo gerado pelas indústrias de conservas e sucos de abacaxi, contribuindo para a manutenção do meio ambiente, além de fornecer outra fonte de agregação de valor para a cadeia produtora da abacaxicultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILIO, G.M.F., HOLSCHUH, H.J., BORA, P.S., 2009. Extraction, bromelain activity and analysis of some chemical parameters in pineapple varieties from Paraíba Rev. Bras. Fruti. 31, 1117-1121.
- AMMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. "Handbook, Protein Purification". 1999.
- ANTUNES, A.M., ONO, E.O., SAMPAIO, A.C., 2008. RODRIGUES, J.D. Physico-chemical and harvest time alterations in pineapple fruits Smooth Cayenne cause by paclobutrazol. Braz. Arch. Biol. Technol. 51, 19-26
- AQUIJE, G. M. F. V., ZORZAL, P. B., BUSS, D. S., VENTURA, J. A., FERNANDES, P. M. B., FERNANDES, A. A. R., 2010. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. Plant. Cell. Rep. 29, 1109-1117.
- BALA, M., ISMAIL, N. A., MEL, M., JAMI, M.S., SALLEH, H. M., AMID, A., 2012. Bromelain Production: Current trends and perspective. Arch. Sci. 65, 369-399.
- BALDINI, V.L., IDEROSA, M., FERREIRA, E.A., SALES, A. M., DRAETTA, I.S., GIACOMELLI, E.J., 1993. Ocorrência da bromelina em espécies e cultivares de abacaxizeiro Colet.Inst.Tecnol.Aliment. 53,44-55.
- BARDIYA, N., SOMAYAJI, D., KHANNA, S, 1996. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. *Bioresour. Technol.* 8, 73–76.
- BARTHOLOMEW, D.P., PAULL, R.E., Rohrbach, K.G., 2003. The Pineapple Botany, Production and Uses, vol. 1. CABI publishing, London, pp. 1–29, 281–288.
- BARTOLOME, A.P., RUPBREZ, P., CARMEN, F., 1995. Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of *Red Spanish* and *Smooth Cayenne* cultivars. Food Chem. 53, 75–79.
- BENGOZI, F.J., SAMPAIO, A.C., SPOTO, M.H.F., MISCHAN, M.M., PALLAMIN, M.L., 2007. Physicochemical quality of pineapples commercialized in the CEAGESP, São Paul]. Rev. Bras. Frut. 29, 540-545.
- BITANGE, N.T., ZHANG, W., SHI, Y.X., WENBIN, Z., 2008. Therapeutic application of pineapple protease (bromelain). Pakistan J. Nutr. 7, 513–520.
- BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., 2008. Enzimas em biotecnologia. Produção Aplicações e Mercado, first ed. Interciência, Rio de Janeiro.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- BRADFORD, M.M.A, 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Bindind. Anal. Biochem. 72, 248-254.

BRATTACHARYA, R., BRATTACHARYA, D., 2009. Resistance of bromelain to SDS binding. *Biochim. Biophys. Acta.* 4, 698 – 708.

CABRAL, H. “Isolamento e caracterização bioquímica de uma cisteína peptidase de Frutos de *Bromelia fastuosa* (Gravatá)”. São José do Rio Preto, Brazil, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, Master dissertation, 2001.

CAO, L., 2005. Protein separation with ion Exchange membrane chromatography. Worcester, United States, Worcester Polytechnic Institute, Master dissertation.

CARVALHO, V.D., 1999. Composição, colheita, embalagem e transporte do fruto In: Cunha, G. A. P. da; Cabral, J. R. S.; Souza, L. F. da S. (Eds.). *O Abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. Embrapa pp. 367-388

CÉSAR, A. C. W., 2005. Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi. Campinas, Brazil; Universidade Estadual de Campinas, PhD tese.

CHAU, T., DAVID, A.M., 1995. Pineapple waste—a novel substrate for citric acid production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 17, 1107–1110.

COSTA, H. B., DELBONI, S. G., FORTUNATO, F. S., VENTURA, J. A., 2009. Proteolytic activity in stems of 'Vitória', 'Smooth Cayenne' and 'Pérola' pineapple plants. *Acta. Hort.* 822, 239-244.

COSTA, H.B., FERNANDES, P.M.B, VENTURA, J.A, 2012. Processo de purificação de bromelina, bromelina purificada e usos da enzima purificada. Brazilian patente PI10201027122, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food quantity. FAOSTAT, 2012. Available at: < www.faostat.fao.org >

DEVAKATE, R. V., PATIL, V. V., WAJE, S. S., THORAT, B.N., 2009. Purification and drying of bromelain. *Sep. Purif. Technol.* 64, 259-264.

E. SILVEIRA, M.E. SOUZA JUNIOR, J.C.C. SANTANA, A. C. CHAVES, A. L. F. PORTO, E. B. Tambourgi,” Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract”. *Braz J Chem Eng.* 26: 149-157, 2009.

FAO, 2008. Statistical Yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, USA, Available at: www.fao.org (accessed 01.07.09).

FRANÇA-SANTOS, A., ALVES, R. S., LEITE, N. S., FERNANDES, R. P. M., 2009. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). *Rev. Scientia Plena.* 5, 1 -6.

FREIMAN, L.O., SABAA SRUR, A.U.O, 1999. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). (L.) Merrill. *Food. Scienc. Tech.*19, 170-173.

GARCIA CARRENO, F.C., DIMES, C.E., HAARD, N.F., 1993. Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65–69.

GAUTAM, S.S., MISHRA, S.K., DASH, V. GOYAL, A.M. G. Rath, “Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant”. *Thai J. Pharm. Sci.*, 34: 67-76, 2010.

HALE, L.P., GREER, P.K., TRINH, C.T., JAMES, C.L., 2005 Proteinase Activity and Stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.* 5, 783-793.

HALE, L.P., GREER, P.K., TRINH, C.T., JAMES, C.L., 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunol.* 5, 783–793.

HARIKRISHNA, S., SRINIVAS, N.D., RAGHAVARAO, K.S.M.S., KARANTH, N.G., 2002. Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 75, 119–183.

HATANO, K., TANOKURA, M.; TAKAHASHI, K., 1998. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. *J. Biochem.* 2, 457-461.

HEBBAR, H. U., SUMANA, B., RAGHAVARAO, K.S.M.S., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresour. Technol.* 99, 4896-4902.

HERNÁNDEZ, M., CARVAJAL, C., MARQUEZ, M., BÁEZ, R., MORRIS, H., SANTOS, R., CHÁVEZ, M. A, 2005. Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de Pina (*Ananas comosus*) com potencialidades de uso em la biotecnologia y la medicina *Revista CENIC Ciências Biológicas.* 36, 1 -12.

IMANDI, S.B., BANDARU, V.V., SOMALANKA, S.R., BANDARU, S.R., GARAPATI, H.R., 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresour. Technol.* 99, 4445–4450.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Tirth edition. IMESP, São Paulo.

KETNAWA, S., CHAIWUT, P., RAWDKUEN, S., 2012. Pineapple Wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food. Bioprod. Process.* 90, 385-391.

KETNAWA, S., RAWDKUEN, S., 2011. Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. *Food Nutri. Sci.* 2, 393–401.

KETNAWA, S., RAWDKUEN, S., CHAIWUT, P., 2010. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. *Biochem. Eng. J.* 52, 205–211.

- KHATOON, H. YOUNUS, H.; SALEEMUDDIN, M., 2007. Stem Bromelain: An enzyme that naturally facilitates oriented immobilization. *Protein Pept. Lett.* 14, 233-236.
- KO, Y.H., KANG, Y.J., 1990. Isolation and partial characterization of proteolytic enzymes from stems of pineapples cultivated in Cheju Island. *Nonmunjip-Cheju Taehakkyo.* 31, 137-142.
- KOH, J., Kang, S.M., Kim, S.J., Cha, M.K., Kwon, Y.J., 2006. Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers. *Fiber Polym.* 7, 180–185.
- KONNO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. 2004. Papain protects treens from herbivorous insects: role of cysteine proteases in látex. *Plant. J.* 37, 370-378.
- KUMAR, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A., 2003. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochem.* 38, 1725–1729.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227, 680-685.
- LEARY, D., VIERROS, M., HAMON, G., ARICO, S., MONAGLE, C., 2009. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Mar. Policy.* 33, 183-194.
- LEE, K.L., ALBEE, K. L., BERNASCONI, R. J., EDMUNDS, T., 1997. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochem. J.* 327,199-202.
- LOPES, F. L. G., JUNIOR, J. B. S., SANTANA, J. C.C. R.R. SOUZA, E. B. Tambourgi, “Utilização de membranas planas na concentração de enzimas bromelinas da polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.)”. *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 7: 33-38, 2005.
- MAHMOOD, R., SALEEMUDDIN, M., 2007. Aditonal stabilization of stem bromelain coupled to a thermosensitive polymer by uniform orientation and using polyclonal antibodies. *Biochemistry.* 72, 307-312.
- MAISONNEUVE et LAROSE et A. C. C. T, Paris. Malezieux, E., Bartholomew, D.P., 2003. Plant Nutrition. In: Bartholomew, D.P.; Paul, R.E., Rohbach, K.G (Eds.). *The pineapple: botany, production and uses.* CABI Publishing, pp.143-165. Motulsky, H., 2003. *GraphPad Prism: user’s guide.* v.4.00. San Diego-CA.
- MAURER, H. R., 2001. Bromelain: Biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life. Sci.* 58, 1234 – 1245.
- MAURER, H.R., 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.* 9, 1234–1245.

MINAMI, Y., DOI, E., HATA, T., 1971. Fractionation, purification, and some properties of proteolytic enzymes from stem bromelain. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1419-1430.

MOAC, Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2008. Statistical Yearbook, Thailand, Available at: www.moac.go.th (accessed 01.07.09).

MUNTARI, B. AMID, A.; MEL, M.; JAMI, M.S.; SALLEH, H.M., 2012. Recombinant bromelain production in *Escherichia coli*: process optimization in shake flask culture by response surface methodology. *AMB Express*. 15, 2-9.

MURACHI, T., 1976. Bromelain enzymes. In: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 19. Academic Press, New York, pp. 475–485.

MURACHI, T., Bromelain enzymes, 1976, in: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, pp. 475–485.

MURACHI, T., NEURATH, H., 1976. Fractionation and specificity studies on Stem Bromelain. *J. Biol. Chem.* 235, 99-107.

NAPPER, A. D., BENNETT, S.P., BOROWSKI, M., HOLDRIDGE, M. B., LEONARD, M. J., ROGERS, E. E., DUAN, Y., LAURSEN, R. A.; REINHOLD, B., SHAME, S. L., 1994. Purification and 120 characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* 301, 727-735.

NETO, J. A. “Purificação de Enzimas” in: U.A. LIMA, E. AQUARONE, W. BORZANI, W. SCHMIDELL, “*Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.*” Blucher, São Paulo, 377-390, 2005.

NEUTEBOOM, L. W., MATSUMOTO, K. O., CHRISTOPHER, D. A., 2009. An Extend AE-Rich N-Terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is posttranslationally removed during ripening. *Plant Physiol.* 151, 515-527.

NIGAM, J.N., 1998. Single cell protein from pineapple canner effluent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 693–696.

NIGAM, J.N., 1999. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *J. Biotechnol.* 72, 197–202.

OMOJASOLA, P., Folakemi, J., Omowumi, P., Ibiyemi, S.A., 2008. Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. *Nat. Sci.* 6, 64–81.

PESSOA JUNIOR, A., KILIKAN, B. V. “Purificação de produtos biotecnológicos”. São Paulo: Manole, 2005. [18]R. V. Devakate, V.V Patil, S.S. Waje, B. N. Thorat, “Purification and drying of bromelain”. *Sep. Purif. Technol.* 64: 259-264, 2009.

PY, C., LACOEUILHE, J.J., TEISSON, C., 1984. L'ananas as culture, sés produits. Salunkhe, D. K., Desai, B.B, 1984. Postharvest biotechnology of fruits. CRC, Boca Raton.

RABELO, A.P.B., TAMBOURGI, E.B., PESSOA JUNIOR, A., 2004. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers, J Chromatogr B. 807, 61 -68.

RASHEEDI, S., HAQ, S. K., KHAN, R. H., 2003. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. Biochemistry (Mosc). 68, 1097- 1100.

ROLLE, R.S., 1998. Enzyme applications for agro-processing in developing countries: an inventory of current and potential applications. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 611–619.

ROWAN, A. D. BUTTLE, D. J. BARRETT, A. J. “The cysteine proteinases of the pineapple plant”. *Biochem. J.* 266: 869-875, 1990.

ROWAN, A. D., BUTTLE, D. J., BARRETT, A. J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* 266, 869-875.

SCHIEBER, A., STINTZING, F.C., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments. *Trend Food Sci. Technol.* 12, 401–413.

SHA, S.F., LI, J.C., WU, J., ZHANG, S.L., 2011. Change the organic acid content and related metabolic enzyme activities in developing ‘Xiping pear fruit. *Afr. J. Agric. Reseach.* 25, 3560-3567.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM O., MANN, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem. Germany*, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVERSTEIN, R. M. KEZDY, F. J.”Characterization of the pineapple stem proteases (Bromelains)”. *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 678-686, 1975.

SUBHABRATA, S., MAYURA, D., 2006. Industrial and clinical applications excluding diagnostic clinical. *Enzymology* 1, 1–25.

SUH, H. J., LEE, H., CHO, H.Y., YANG, H.B., 1992. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Hanguk Nonghwa Hakhoe.* 35, 300-307.

SWITZER, R.L., GARRITY, L.F., 1999. *Experimental Biochemistry*, vol. 2. W.H. Freeman, New York.

TANAKA, K., HILARY, Z.D., ISHIZAKI, A., 1999. Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 642–646.

- THANONG, R., 1985. Utilization pineapple waste for frozen pineapple concentrate. J. Kasetsart Univ. 19, 101–109.
- UHLIG, H., 1998. Industrial Enzymes and their Applications, vol. 2. John Wiley & Sons, New York, pp. 146–147.
- UMESH, H., SUMANA, B., RAGHAVARAO, K.S.M.S., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. Bioresour. Technol. 99, 4896–4902.
- VALLES, D., FURTADO, S., CANTERA, A.M.B., 2007. Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). Enzyme Microb. Technol. 40, 409–413.
- VENTURA, J. A., CABRAL, J. R. S., MATOS, A. P. , COSTA, H., 2009. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. Acta Hort. 822, 51 -54.
- VENTURA, J.A., ZAMBOLIM, L., 2002. Controle das doenças do abacaxizeiro, in: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., MONTEIRO, A.J.A., COSTA, H. (Eds.), Controle de doenças de plantas fruteiras. Federal University of Viçosa, Viçosa, pp. 445 - 510.
- WAGNER, F. W., 1986. Assessment of methodology for the purification, characterization, and measurement of proteases, in: Dalling, M. J. Plant (Ed.) Proteolytic Enzymes, Florida.
- WALSH, G., 2002. Protein Biochemistry and Biotechnology, vol. 1. John Wiley and Sons, New York, pp. 51–210, 419–435
- WEERAHEWA, D., ADIKARAN, N.K.B., 2005. Some biochemical factors underlying the differential susceptibility of two pineapple cultivars to internal browning disorder. Ceylon J. Sci. (Biological Sciences) 34, 7-20